

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Anandamid-vermittelte Aufnahme von siRNA in Immunzellen

Julian Willibald
aus
Garmisch-Partenkirchen

2013

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsverordnung der LMU vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Thomas Carell betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München,

.....
Julian Willibald

Dissertation eingereicht am 15.01.2023

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Carell
2. Gutachter: Prof. Dr. Karl-Klaus Conzelmann

Mündliche Prüfung am 30.04.2013

Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater *Prof. Dr. Thomas Carell* für die interessante Themenstellung und für die exzellenten Arbeitsbedingungen. Sein Vertrauen und seine Geduld haben mir stets viel Raum für meine wissenschaftliche Entfaltung gegeben.

Herrn Prof. Dr. Karl-Klaus Conzelmann danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Während meiner Promotion wurde ich durch ein Stipendium der *Novartis Pharma AG* gefördert, für deren finanzielle Unterstützung ich mich bedanken möchte.

Den Mitarbeitern der Analytikabteilung, *Herrn Werner Spahl* und *Frau Sonja Kosak* danke ich für die Anfertigung der Massenspektren. Bei *Frau Claudia Dubler* und *Herrn Dr. David Stevenson* möchte ich mich ganz herzlich für ihr großes Engagement bei der Anfertigung der Kernresonanzspektren bedanken. Großer Dank gilt auch *Herrn Michael Gayer* für die kompetente und freundliche Zusammenarbeit und sein uneingeschränktes Engagement.

Dr. Markus Müller danke ich für seine Hilfsbereitschaft und sein immer offenes Ohr für alle Belange. Darüber hinaus möchte ich mich für zahlreiche Diskussionen bedanken, bei denen mir seine kritische und ehrliche Sicht der Dinge oft eine sehr große Hilfe war. *Frau Slava Gärtner* danke ich für ihre Unterstützung und Hilfe in organisatorischen Belangen. Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit, den Teamgeist und die tolle Atmosphäre über all die Jahre. Am meisten werden mir unsere geistreichen Konversationen beim Mittagessen fehlen.

Besonderer Dank gilt meinen Mitstreitern im Männerlabor „*Chemists for a better world*“ für die unvergessliche Zeit und vor Allem für Eure Freundschaft. Dabei gilt *Stefan Prill* und *Felix Gnerlich* großer Dank für die grandiose Zusammenarbeit und sehr viel Spaß bei der Arbeit. *Dr. Christian Trindler* danke ich für zahlreiche wertvolle Ratschläge und immer konstruktive Diskussionen und natürlich auch für sehr viel Spaß bei der Arbeit.

Den größten Dank möchte ich *Johannes Harder* aussprechen. Danke für die fantastische Zusammenarbeit auf unserem gemeinsamen Projekt und Deine unerschöpfliche Hilfsbereitschaft! Darüber hinaus vielen Dank für die Korrektur dieser Arbeit, die du leider fast allein stemmen musstest.

Ebenfalls großen Dank möchte ich an meine Praktikanten aussprechen, die meine Arbeit entscheidend voran gebracht haben. Dabei gilt vor Allem *Benjamin Hackner* größter Dank für seine zellbiologischen und biochemischen Hilfestellungen. *Victor Brantl* möchte ich für seinen grandiosen Beitrag zur Konstruktion der verzweigten Oligonukleotid-Strukturen danken.

Neben *Johannes Harder* haben zur Korrektur dieser Arbeit beigetragen: *Dr. Markus Müller*, *Felix Gnerlich*, *Dr. Tim Gehrke*, *Benjamin Hackner*, *Michael Ehrlich*, *Sandra Koch* und *Dominik Daniel*. Vielen Dank für Eure Hilfe.

Natürlich möchte ich mich auch bei meiner Freundin *Constanze Kratzer* bedanken, deren Hilfe den entscheidenden Beitrag für meine berufliche Zukunft geliefert hat.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

J. Willibald, J. Harder, K. Sparrer, K.-K. Conzelmann, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12330-12333, *Click-Modified Anandamide siRNA Enables Delivery and Gene Silencing in Neuronal and Immune Cells*.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	VI
SUMMARY	IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 GRUNDLAGEN DER RNA-INTERFERENZ.....	1
1.1.1 Mechanismus der RNA-Interferenz.....	2
1.1.2 Chemische Modifikation von siRNA	5
1.2 TRANSPORT VON siRNA.....	6
1.2.1 Indirekter Transport von siRNA.....	6
1.2.2 Direkter Transport von siRNA	7
1.3 siRNA LIGANDEN-KONJUGATE	9
1.3.1 Saccharid-modifizierte siRNA.....	10
1.3.2 Steroid/Lipid-modifizierte siRNA.....	12
1.3.3 Vitamin-modifizierte siRNA.....	15
1.3.4 Peptid-modifizierte siRNA	17
1.3.5 Aptamer-modifizierte siRNA	19
1.4 DAS ENDOCANNABINOIDSYSTEM.....	21
1.4.1 Die Cannabinoidrezeptoren	21
1.4.2 Das Endocannabinoid Anandamid.....	22
1.4.3 Aufnahme von Anandamid	23
1.4.4 Selektivität der Aufnahme von Anandamid	26
1.4.5 Anandamid Aufnahmesonden	27
2 AUFGABENSTELLUNG	29
3 ANANDAMID-VERMITTELTE AUFNAHME VON OLIGONUKLEOTIDEN IN IMMUNZELLEN	30
3.1 FESTPHASENSYNTHESE VON ANANDAMID-MODIFIZIERTEN OLIGONUKLEOTIDEN	31
3.2 ANANDAMID-MODIFIKATION VON OLIGONUKLEOTIDEN DURCH CLICK-CHEMIE	32
3.3 AUFNAHMESTUDIEN MIT ANANDAMID-MODIFIZIERTEN OLIGONUKLEOTIDEN	34
4 RNA-INTERFERENZ DURCH ANANDAMID-MODIFIZIERTE siRNA IN IMMUNZELLEN	37
4.1 SYNTHESE MODIFIZIERTER LUCIFERASE-siRNA.....	37
4.1.1 Synthese von 2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridinphosphoramidit 7.....	38
4.1.2 Synthese von 2'-Fluoro-Disulfanyloktadiinyl-Uridinphosphoramidit 8	39
4.1.3 RNA Festphasensynthese.....	42
4.1.4 Synthese funktioneller Azide.....	46
4.1.5 Modifizierte Luciferase-siRNA.....	50
4.2 DUALES LUCIFERASE REPORTERSYSTEM	51
4.3 LUCIFERASE-ASSAYS I.....	53
4.3.1 Kontrollexperimente	53
4.3.2 Regulation mit Anandamid-modifizierter siRNA.....	54
4.3.3 Einfluss der Stabilität auf die Effektivität der siRNA	56
4.3.4 Regulation mit Hilfe des Adapter-Konstrukts	58
4.3.5 Regulation mit Arachidonoyl-ethylenglykol- und Retroanandamid-siRNA	59
4.4 VERZWEIGTE siRNA-STRUKTUREN	61

4.4.1	Synthese von Porphyrin-Tetraazid und Anandamid-Triazid.....	62
4.4.2	Click-Reaktion eines Mehrfachazids mit Oligonukleotiden.....	64
4.4.3	Verzweigte Luciferase-siRNA	67
4.4.4	Glycosylierte Luciferase-siRNA.....	67
4.5	LUCIFERASE-ASSAYS II.....	69
4.5.1	Regulation mit verzweigter Luciferase-siRNA.....	69
4.5.2	Regulation mit unterschiedlich verzweigter Luciferase-siRNA.....	71
4.5.3	Regulation bei zusätzlicher Glucose-Modifikation.....	73
5	REGULATION EINES ENDOGENEN GENS DURCH ANANDAMID-MODIFIZIERTE SIRNA	74
5.1	ANTIGEN-INDUZIERT STIMULATION VON MASTZELLEN	74
5.2	SYNTHESE MODIFIZierter SYK-KINASE SIRNA	75
5.2.1	Modifizierte SYK-Kinase siRNA.....	76
5.3	REGULATION DER KINASE SYK DURCH MODIFIZIERTE SIRNA.....	77
6	AUSBLICK.....	80
7	EXPERIMENTALTEIL	82
7.1	MATERIALIEN UND METHODEN	82
7.2	SYNTHESEVORSCHRIFTEN	84
7.3	OLIGONUKLEOTIDSYNTHESE UND CLICK-MODIFIKATION	100
7.3.1	Festphasensynthese.....	100
7.3.2	Entschützung und Aufreinigung von Oligonukleotiden.....	101
7.3.3	Click-Modifikation von Oligonukleotiden.....	102
7.4	ZELL-, MIKRO- UND MOLEKULARBIOLOGISCHES ARBEITEN	104
7.4.1	Zellkultur	104
7.4.2	Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	104
7.4.3	Konfokalmikroskopie	104
7.4.4	Amplifizierung des Plasmidvektors psiCHECK™-2	105
7.4.5	Duales Luciferase Reportersystem.....	106
7.4.6	Reverse Transkriptase quantitative realtime PCR.....	107
	LITERATURVERZEICHNIS.....	107

Zusammenfassung

Die Expression eines Gens lässt sich mit Hilfe von *small interfering RNA* (siRNA) gezielt regulieren. Dabei wird die Expression eines Proteins unterdrückt, indem die korrespondierende mRNA Sequenz-spezifisch gespalten wird. Die siRNA besteht für gewöhnlich aus einem Duplex mit 19 bis 21 Nukleotiden und zwei Nukleotid-Überhängen an den 3'-Enden.^[1] Innerhalb des Duplexes besitzt ein Strang die komplementäre Sequenz der mRNA und ermöglicht dadurch deren Sequenz-spezifische Adressierung. Die Regulation erfolgt unter Beteiligung eines Proteinkomplexes, dem sogenannten *RNA-induced silencing complex* (RISC).^[2] Dieser Prozess verspricht großen therapeutischen Nutzen, da sich damit prinzipiell jedes Gen regulieren lässt.^[3] Eine der größten Hürden stellt allerdings der Transport der siRNA in die Zelle dar,^[4] da siRNA aufgrund ihrer negativen Ladung und ihrer Größe die Zellmembran nicht durchdringen kann.^[5] Diverse Transfektionsansätze erwiesen sich angesichts ihrer Toxizität und ihrer Unspezifität als ungeeignet, da *in vivo* die gezielte Regulation eines Gens nur durch eine Zell-spezifische Aufnahme der siRNA gewährleistet werden kann.^[5b, 6] Ein vielversprechender Lösungsansatz des zellspezifischen und nichttoxischen Transports von siRNA stellt deren Modifikation mit einem Rezeptor-Liganden dar. Dies ermöglicht die gezielte Adressierung von Zellen über den entsprechenden Rezeptor. Die Aufnahme der siRNA erfolgt durch Rezeptor-vermittelte Endozytose.

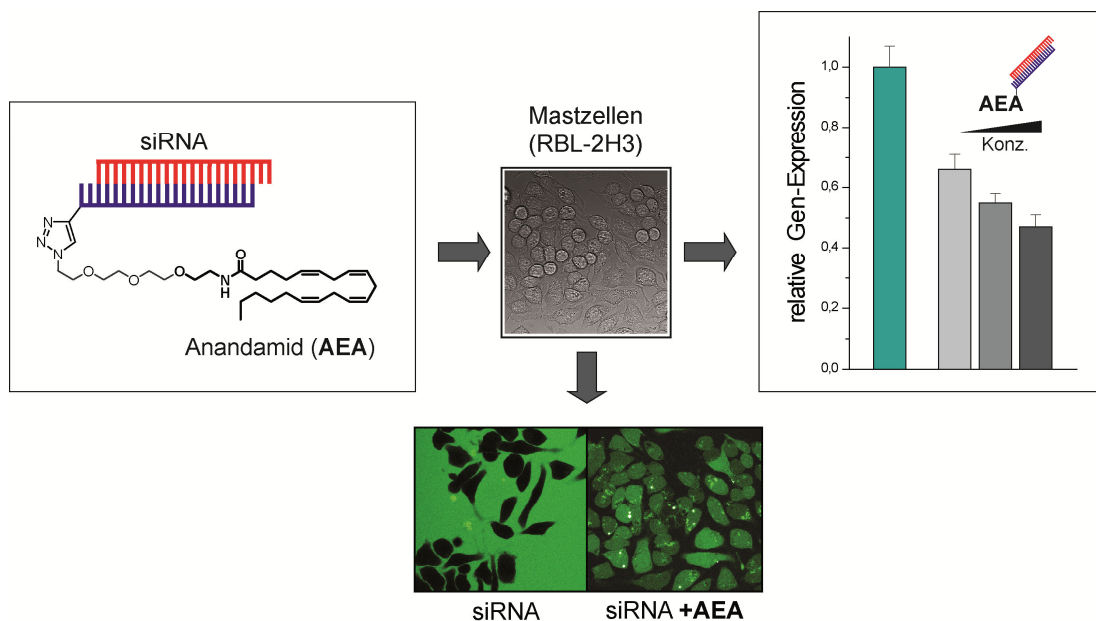


Abbildung I: Die Modifikation der siRNA mit dem Cannabinoidrezeptor-Liganden Anandamid (AEA) ermöglicht deren Aufnahme in Mastzellen RBL-2H3. Die aufgenommene siRNA führt zur konzentrationsabhängigen Regulation der Expression einer Luciferase innerhalb der Mastzellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die siRNA mit dem Endocannabinoid Anandamid modifiziert, um damit deren spezifische Aufnahme in Nerven- und Immunzellen zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurde die siRNA mit einem Alkin-Nukleosid modifiziert und anschließend durch Kupfer(I) katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (Click-Chemie) mit einem Anandamid-Azid funktionalisiert (Abbildung I).

Anandamid (AEA) ist ein endogener Ligand der Cannabinoid-Rezeptoren, welche innerhalb des Nerven- und Immunsystems exprimiert werden.^[7] Nach deren Adressierung wird Anandamid ins Innere der Zellen transportiert und anschließend intrazellulär abgebaut. Dieser Transportmechanismus konnte bisher trotz intensiver Forschung nicht vollständig aufgeklärt werden. Die Verwendung von AEA als Transportvehikel für Wirkstoffe und Oligonukleotide ist derzeit gänzlich unerforscht.

Als Modellsystem für die AEA-vermittelte Aufnahme der siRNA wurde die Mastzelllinie RBL-2H3 gewählt. Mastzellen sind multifunktionale Zellen mit zentraler Bedeutung innerhalb des Immunsystems.^[8] Da RBL-2H3 Zellen alle notwendigen biochemischen Werkzeuge für die Biosynthese, Erkennung, Aufnahme und Verstoffwechselung von Endocannabinoiden besitzen, dienten sie für zahlreiche Studien als Modellsystem bezüglich der Aufnahme von AEA.^[7, 9] Um zu zeigen, dass sich AEA als Transportvehikel für siRNA nutzen lässt, wurde die Aufnahme der AEA-modifizierten siRNA in erster Instanz mikroskopisch untersucht. Zu diesem Zweck wurde die siRNA zusätzlich mit Fluorescein markiert und die Aufnahme unter einem konfokalen Fluoreszenz-Mikroskop verfolgt (Abbildung I). Dabei führte die Zugabe von AEA-modifizierter siRNA zu einer intensiven Fluoreszenz innerhalb der Zellen, wohingegen bei Zugabe von siRNA ohne AEA-Modifikation keine intrazelluläre Fluoreszenz detektiert werden konnte. Zusammenfassend ließ sich dies als AEA-vermittelte Aufnahme der siRNA interpretieren, wodurch die Verwendung von AEA als Transportvehikel für die Aufnahme von Oligonukleotiden erstmals experimentell bestätigt wurde.

Darüber hinaus konnte erstmals die Suppression eines Gens durch die AEA-vermittelte Aufnahme von siRNA in Mastzellen gezeigt werden (Abbildung I). Die Regulationsfähigkeit der aufgenommenen siRNA wurde anhand eines Reportersystems auf Luciferase-Basis quantifiziert. Dabei bewirkte die Zugabe von AEA-modifizierter siRNA die konzentrationsabhängige Regulation der Expression einer Luciferase mit einer maximalen Reduktion um 50 %.

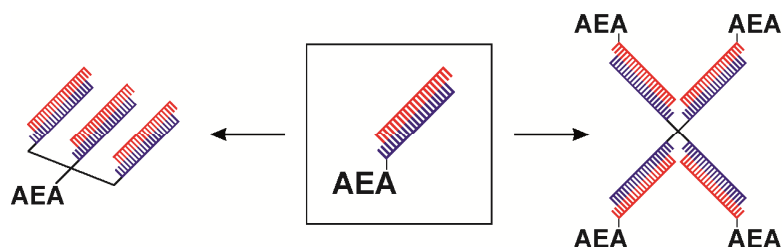


Abbildung II: Ausbau der AEA-siRNA zu verzweigten siRNA-Strukturen. **Rechte Struktur:** Konstantes Verhältnis von AEA-Modifikation und siRNA-Duplex. **Linke Struktur:** Kompakte siRNA-Verzweigung mit einer einzelnen AEA-Modifikation.

Diverse Experimente zur Optimierung der Stabilität, der intrazellulären Verfügbarkeit und der Aufnahme der siRNA führten zu der These, dass deren maximale Effektivität maßgeblich durch die Aufnahmefähigkeit des Transportsystems begrenzt wurde. Daraufhin wurden zwei unterschiedlich verzweigte siRNA-Strukturen konstruiert, um dadurch pro AEA-vermittelter Aufnahme mehrere siRNAs in die Zelle zu transportieren (Abbildung II). Die Konstruktion der verzweigten siRNA-Strukturen erfolgte mittels Click-Chemie durch den Einsatz von Mehrfach-Aziden als Grundgerüst. Die Ausarbeitung der hierfür notwendigen Reaktionsbedingungen für die effiziente Synthese verzweigter Oligonukleotid-Strukturen erfolgte ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit.

Um die Effektivität der AEA-modifizierten siRNA in Relation zu bestehenden Liganden-Konjugaten setzen zu können, wurde zusätzlich eine Cholesterol-modifizierte siRNA synthetisiert. Cholesterol-modifizierte siRNA stellt derzeit das wohl erfolgreichste Liganden-Konjugat dar, konnte allerdings im Vergleich zu AEA-modifizierter siRNA nur eine geringere Effektivität aufweisen (Abbildung IIIa).

Bezogen auf die einfachen Duplexe bewirkten die beiden verzweigten Strukturen eine deutlich gesteigerte Reduktion der Gen-Expression. Dies deutete darauf hin, dass sich die Kapazität des Transportsystems durch die Verwendung verzweigter siRNA-Strukturen erhöhen ließ, da hier pro AEA-vermittelter Aufnahme mehrere siRNAs in die Zelle transportiert wurden. Da das einfach AEA-modifizierte Konstrukt trotz einer geringeren Anzahl an siRNA nahezu die gleiche Regulation wie das vierfach AEA-modifizierte Konstrukt bewirkte, konnte dieser verzweigten Struktur das größere Potential zugeordnet werden (Abbildung IIIa). Die Effektivität dieser verzweigten siRNA-Struktur ließ sich durch zusätzliche 3'-Glycosylierung weiter steigern. Letztendlich bewirkte die verzweigte Struktur in Kombination mit der Glycosylierung eine Reduktion der Luciferase-Expression um 76 %, was einer nahezu 2.5-fachen Steigerung der Regulations-Fähigkeit gegenüber dem ausschließlich AEA-modifizierten Duplex entsprach (Abbildung IIIb).

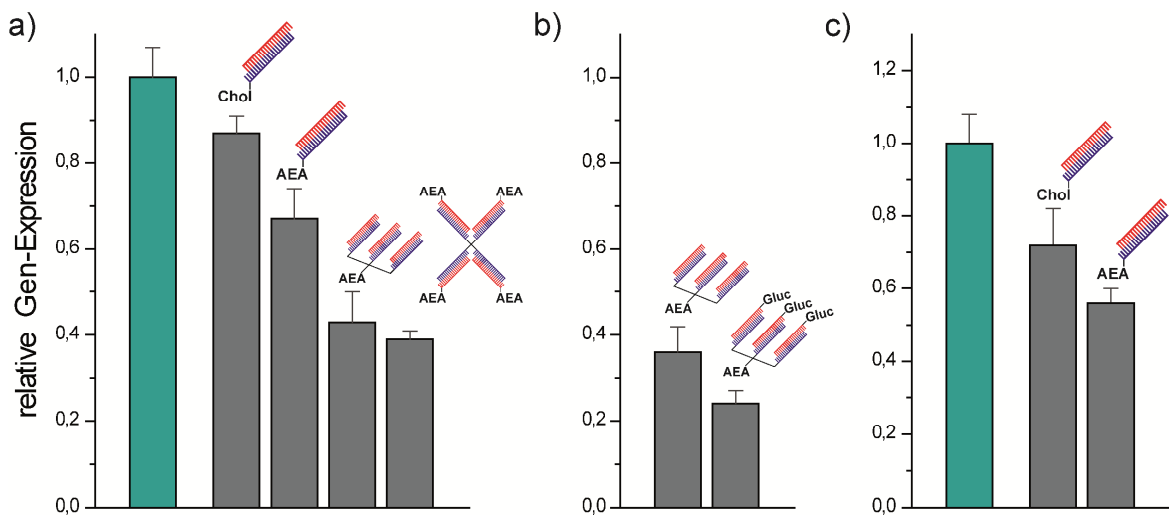


Abbildung III: a) Regulation der Luciferase-Expression durch AEA- und Cholesterol-modifizierte siRNA sowie durch verzweigte siRNA-Strukturen, b) Gesteigerte Effektivität durch Glycosylierung der siRNA, c) Reduzierte Expression des endogenen Proteins SYK.

Im Hinblick auf potentielle Anwendungen wurde abschließend versucht, mit Hilfe von AEA-modifizierter siRNA ein therapeutisch relevantes Enzym innerhalb des Immunsystems zu regulieren. Dabei fiel die Wahl auf die Protein Tyrosin Kinase SYK, welche eine zentrale Rolle bei der Ausschüttung entzündlicher Botenstoffe durch die Stimulation von Mastzellen einnimmt.^[10] Die Kinase SYK konnte durch die Zugabe von AEA-modifizierter siRNA ebenfalls erfolgreich reguliert werden, wobei sich die Effektivität der Regulation nahezu identisch zur Regulation der Luciferase verhielt (Abbildung IIIc). Damit konnte erstmals die effektive Regulation eines endogenen Gens durch die AEA-vermittelte Aufnahme von siRNA in Immunzellen gezeigt werden.

Summary

The expression of a gene can be selectively regulated with small interfering RNA (siRNA) by splitting the corresponding mRNA. This sequence-specific process finally leads to a reduced protein expression. Usually siRNA consists of a duplex with 19 to 21 Nucleotides and two overhanging nucleotides at the 3'-ends.^[1] One strand of the duplex exhibits a complementary sequence of the mRNA, which facilitates the sequence-specific addressing. The regulation is performed with the involvement of a protein complex, the so-called *RNA-induced silencing complex* (RISC).^[2] This process promises great therapeutic benefit by enabling the general regulation of every gene.^[3] However, one of the major obstacles remains the delivery of siRNA into the cell,^[4] as its negative charge and size^[5] prevents siRNA from passing the cell membrane. Since targeted regulation of a gene *in vivo* requires cell-specific uptake of siRNA,^[5b, 6] various transfection approaches proved to be unsuitable by showing cytotoxic and unspecific properties. A prospective strategy for cell-specific and nontoxic delivery of siRNA is its modification with a receptor-ligand. This allows targeted addressing of the cells via the corresponding receptor, whereby the siRNA uptake occurs through receptor-mediated endocytosis.

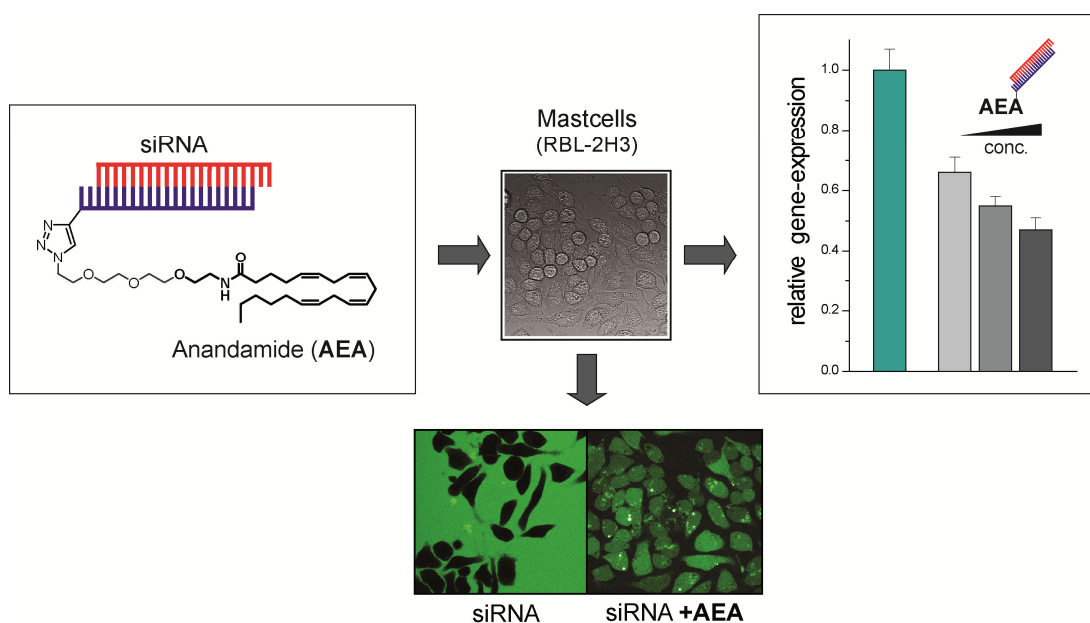


Figure I: Modification of siRNA with the cannabinoidreceptor-ligand anandamide (AEA) enables uptake into mast cells RBL-2H3. After internalization, the siRNA leads to a concentration-dependent regulation of luciferase expression.

In this thesis, siRNA was modified with the endocannabinoid anandamide to enable specific uptake in neuronal and immune cells. To achieve this, the siRNA was modified with an alkyne-nucleoside and subsequently functionalized with an anandamide azide by copper(I) catalyzed azide-alkyne cycloaddition (click chemistry) (Figure I).

Anandamide (AEA) is an endogenous ligand of the cannabinoid receptors, which are expressed within the nervous and the immune system.^[7] After addressing the receptors, anandamide is transported into the cells and metabolized afterwards. Despite intensive research, the exact transport mechanism could not be entirely elucidated. The application of AEA as transport vehicle for drugs or oligonucleotides is completely unexplored.

The mast cell line RBL-2H3 was chosen to serve as a model system for AEA-mediated uptake of siRNA. Mast cells are multifunctional cells with central importance in the immune system.^[8] RBL-2H3 cells have served as the model system for AEA uptake in numerous studies, since they possess all necessary biochemical components required for endocannabinoid biosynthesis, recognition, uptake and metabolism.^[7g, 9] In order to show that AEA can be applied as the transport vehicle for siRNA, the uptake of AEA-modified siRNA was first investigated by microscopy, during which the siRNA was additionally labeled with fluorescein and the uptake was monitored under a fluorescence microscope (Figure I). The addition of AEA-modified siRNA resulted in an intensive fluorescence inside the cells, whereas no intracellular fluorescence could be detected after adding non-modified siRNA. In sum, these results could be interpreted as AEA-mediated uptake of siRNA. Thus, the application of AEA as a transport vehicle for oligonucleotide uptake was experimentally confirmed for the first time.

Furthermore, successful gene suppression by AEA-mediated uptake of siRNA in mast cells could be shown for the first time (Figure I). The regulation capacity of internalized siRNA was quantified with a reporter system based on luciferase activity, whereby the addition of AEA-modified siRNA resulted in a concentration-dependent regulation of luciferase expression with a maximum reduction of up to 50 %.

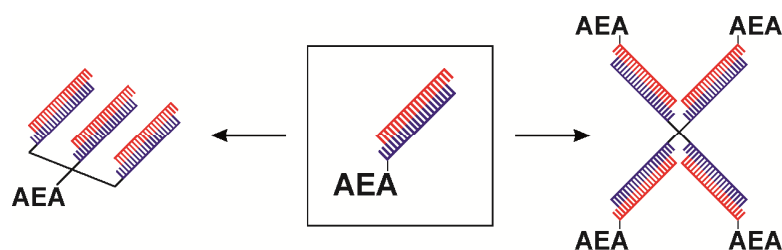


Figure II: Expansion of AEA-siRNA to dendritic structures. **Right structure:** Constant ratio of AEA-modification and siRNA-duplex. **Left structure:** Compact siRNA-branching with single AEA-modification.

Diverse optimization experiments in terms of stability, intracellular availability and uptake of the siRNA resulted in the theory that the maximum siRNA efficacy was significantly limited by the capacity of the transport system. Consequently, two different dendritic siRNA-structures were designed (Figure II). With these structures, multiple siRNAs are transported into the cell per anandamide-mediated uptake. The construction was performed by click chemistry with multivalent azido building-blocks. The definition of reaction conditions for the efficient synthesis of dendritic oligonucleotides was also conducted as part of this thesis.

To examine the efficacy of AEA-modified siRNA in relation to existing ligand conjugates, cholesterol-modified siRNA was synthesized. Cholesterol-modified siRNA currently represents the probably most successful ligand conjugate. However, this conjugate turned out to be less effective compared to AEA-modified siRNA (Figure IIIa).

The dendritic structures achieved a clearly increased reduction of gene expression in relation to the basic duplexes. This indicated that assignment of the dendritic structures could raise the capacity of the transport system by carrying multiple siRNAs per AEA-mediated uptake into the cell. The single AEA-modified construct attained a regulation efficacy comparable to the quadruple AEA-modified construct despite a reduced number of duplexes. Therefore, the greater potential could be assigned to this dendritic structure. This efficacy of this structure could be further increased by 3'-glycosylation. Finally, the dendritic structure achieved 76 % reduction of luciferase expression in combination with glycosylation. This correlates with a 2.5-fold progression compared to the basic AEA-modified duplex (Figure IIIb).

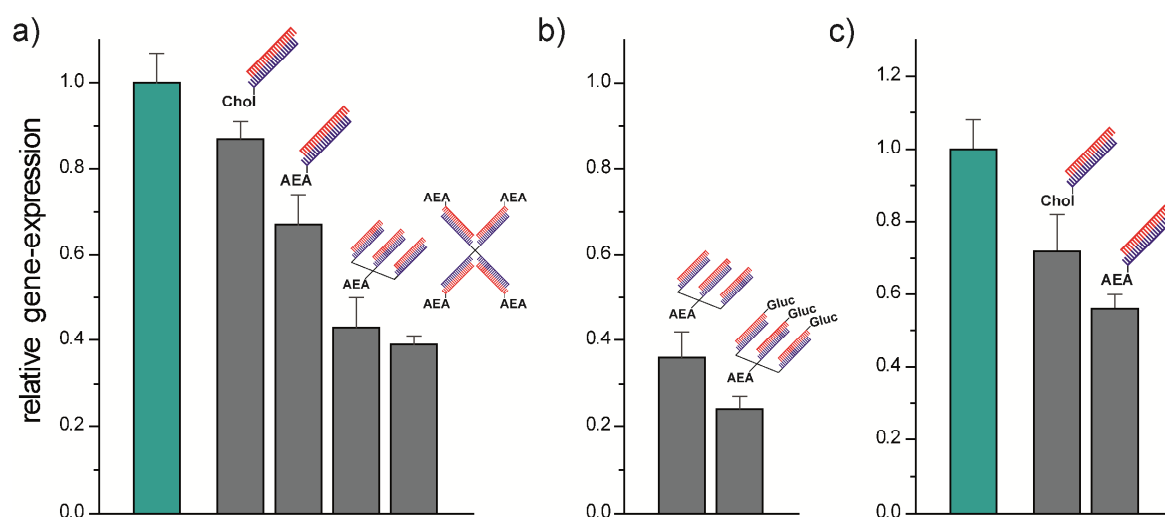


Figure III: a) Regulation of luciferase expression by AEA- and cholesterol-modified siRNA and by dendritic siRNA-structures, b) Increased efficacy of glycosylated siRNA, c) Reduced expression of the endogenous protein SYK.

In respect of potential applications, a therapeutically relevant enzyme within the immune system was regulated with AEA-modified siRNA. The chosen candidate was spleen tyrosine kinase SYK as it exhibits a central role within the antigen-induced release of inflammatory mediators by mast cells.^[10] The expression of Kinase SYK could successfully be regulated by adding AEA-modified siRNA and the efficacy was almost identical to the regulation of luciferase expression (Figure IIIc). In summary, for the first time an endogenous gene could be regulated in immune cells by AEA-mediated uptake of siRNA.

1 Einleitung

Das folgende Kapitel soll einen Einblick über das Wirkprinzip von siRNA geben und beschreibt darüber hinaus diverse Methoden des Transports von siRNA in Zellen. Dabei wurde der Fokus auf bestehende siRNA-Liganden Konjugate für den Zell-spezifischen Transport gerichtet. Im letzten Abschnitt wird das Endocannabinoid-System vorgestellt, welches in dieser Arbeit zum Transport eines siRNA-Liganden Konjugats genutzt wurde. In diesem Zusammenhang wird die zelluläre Aufnahme des verwendeten Liganden Anandamid detailliert beschrieben.

1.1 Grundlagen der RNA-Interferenz

Die Beobachtung katalytisch aktiver RNA durch *Cech*^[11] und *Altman*^[12] in den frühen 1980ern änderte die bis dahin geltende Annahme, dass nur Proteine katalytische Aktivität besitzen und RNA lediglich zur Produktion von Proteinen dient. Die Entdeckung dieser sogenannten Ribozyme wurde 1989 mit dem Nobelpreis für Chemie^[13] honoriert und führte zu verstärkter Forschung auf dem Gebiet regulatorisch aktiver RNA. *Fire* und *Mello* beschrieben daraufhin 1998 erstmals das Phänomen der sogenannten RNA-Interferenz (RNAi).^[14] Dabei gelang ihnen durch Injektion von langer doppelsträngiger RNA (dsRNA) in den Fadenwurm *C. elegans* die gezielte Regulation des homologen Gens der dsRNA. Dieser in der Natur konservierte Prozess der Genregulation,^[15] welcher sich wahrscheinlich als Abwehrmechanismus gegen Viren^[14] und als Regulationsmechanismus für genetische Instabilität^[16] entwickelt hat, ermöglicht im Prinzip die Entwicklung einer gänzlich neuen Therapie-Methode: Anstatt ein Enzym durch ein kleines Molekül zu inhibieren, kann dessen Expression mittels RNAi gezielt unterdrückt werden. Der entscheidende Vorteil dieser Methode liegt darin, dass prinzipiell jedes Gen adressiert werden kann.^[3] Für ihre Entdeckung dieses therapeutisch vielversprechenden Prozesses wurden *Fire* und *Mello* 2006 mit dem Nobelpreis für Medizin^[17] ausgezeichnet. Neben dem direkten therapeutischen Nutzen findet RNAi heutzutage speziell in der *Target*-Validierung Anwendung,^[18] da mit ihrer Hilfe die Funktion eines Gens wesentlich schneller untersucht werden kann als mit niedermolekularen Inhibitoren.^[19]

RNA-Interferenz mit Hilfe von langer dsRNA konnte jedoch anfänglich bei Säugern nicht angewendet werden, da dsRNA bestehend aus mehr als 30 Basenpaaren die sogenannte Interferon-Antwort auslöst.^[20] Dabei wird die dsRNA als Pathogen interpretiert und daraufhin die Protein-Kinase R aktiviert, welche die Protein-Synthese der Zelle blockiert und so zum Zelltod führt.^[21] *Tuschl* und *Hannon* lösten dieses Problem, indem sie zeigten, dass die Aktivität der dsRNA letztendlich auf Fragmente bestehend aus 21 bis 23 Basenpaaren zurückzuführen ist.^[1a, b] *Tuschl* und seine Mitarbeiter konnten in einer weiteren Studie erstmals mit Hilfe synthetischer 21-mer dsRNA die Expression eines Gens in Säugerzellen unterdrücken und ermöglichten damit den breiten Einsatz dieser sogenannten „*small interfering RNA*“ (siRNA) als Technologie in der Forschung und in der Therapie.^[22] Auf Basis dieser Entdeckung, besteht siRNA in heutigen Anwendungen meist aus einem RNA-Duplex mit 21 bis 23 Nukleotiden und zwei Nukleotid-Überhängen an den 3'-Enden (Abbildung 1.1).^[1c, d] Ein Strang, der sogenannte *antisense*-Strang (oder *guide*-Strang), besitzt dabei eine komplementäre Sequenz zur adressierten mRNA. Der andere Strang des Duplexes besitzt die homologe Sequenz der mRNA und wird als *sense*-Strang (oder *passenger*-Strang) bezeichnet.

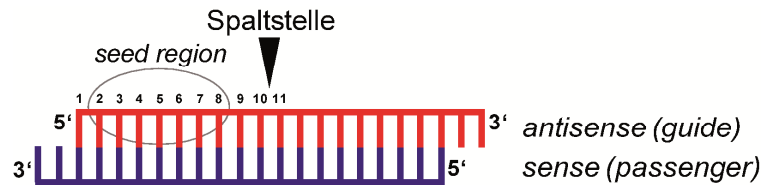


Abbildung 1.1: Prinzipieller Aufbau einer siRNA, bestehend aus einem 21mer RNA-Duplex mit zwei Nukleotid-Überhängen an den 3'-Enden. Der *antisense*-Strang (*guide*) besitzt die komplementäre Sequenz zur adressierten mRNA. Der *sense*-Strang (*passenger*) weist die homologe Sequenz zur mRNA auf. Über die *seed region* wird die Erkennung der mRNA initiiert. Die mRNA wird zwischen Position 10 und 11 ausgehend vom 5'-Ende des *antisense*-Strangs geschnitten (Spaltstelle).

Im Wirkmechanismus unterscheidet sich siRNA grundlegend von *antisense*-Oligonukleotiden^[23] (kurze einzelsträngige RNA oder DNA), welche mRNA lediglich binden und dadurch deren Translation inhibieren. Die Effektivität der siRNA ist gegenüber *antisense*-Oligonukleotiden bis zu 1000-fach erhöht,^[24] was sich durch einen katalytischen Wirkmechanismus erklären lässt.^[25] Dieser Mechanismus wird im folgenden Abschnitt detailliert vorgestellt.

1.1.1 Mechanismus der RNA-Interferenz

Neben exogener siRNA existiert auch kurze dsRNA endogenen Ursprungs mit regulatorischen Eigenschaften. Diese sogenannte *micro* RNA (miRNA) besteht ebenfalls aus 21-23 Nukleotiden und hat eine entscheidende Rolle in der posttranslationalen Regulation von Genen bezüglich Proliferation, Hämatopoese (Blutbildung), Apoptose^[26] und weiterer biologischer Funktionen.^[27] Man geht heute davon aus, dass mindestens 30 % aller humanen Gene durch miRNA reguliert werden.^[28] Zur Regulation eines Gens assoziieren siRNA und miRNA mit einem Proteinkomplex, dem sogenannten *RNA-induced silencing complex (RISC)*.^[2] Der dadurch aktivierte *RISC* reguliert sequenzspezifisch die Expression eines Gens, indem die korrespondierende mRNA entweder gespalten oder deren Translation unterdrückt wird. Dabei unterscheiden sich siRNA und miRNA prinzipiell darin, dass die korrespondierende mRNA durch siRNA gespalten^[29] und durch miRNA deren Translation unterdrückt wird.^[30] Dieses unterschiedliche Wirkprinzip wird kontrolliert durch die Ausbildung des Duplexes zwischen dem aktiven *RISC* und der korrespondierenden mRNA: Bei absoluter Paarung wird die mRNA gespalten^[25, 30b, 31] und bei Fehlpaarung lediglich deren Translation unterdrückt.^[30a, 32] Das Prinzip dieser posttranskriptionalen Genregulation durch siRNA und miRNA ist in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt.

Der technologische Einsatz der RNA-Interferenz erfordert zunächst die experimentelle Transfektion exogener siRNA in die Zelle. Dieser Vorgang wird in den Kapiteln 1.2 und 1.3 eingehend beschrieben. Innerhalb der Zelle wird siRNA vorwiegend durch die Prozessierung langer dsRNA durch die Ribonuklease *Dicer* generiert.^[15a] Diese lange dsRNA kann ihren Ursprung in der Replikation viraler RNA, in konvergenter Transkription zellulärer Gene oder mobiler genetischer Elemente und in selbstkomplementären Transkripten haben.^[33] Darüber hinaus können kleine RNA-Haarnadelstrukturen, resultierend aus der Transkription viraler Vektoren, ebenfalls als Substrat für den *Dicer* dienen.^[34] Diese so genannte *short hairpin* RNA (shRNA) besteht meist aus 19 bis 29 Basenpaaren und einer Schleife aus neun Nukleotiden.^[34] Die Biogenese der miRNA erfolgt im Zellkern durch Transkription von endogenen miRNA Genen^[33] zu primärer miRNA (pri-miRNA).^[35] Diese pri-miRNA wird von einem Proteinkomplex, bestehend aus der der RNase III *Drosha*^[35] und dessen Kofaktor *Pasha*,^[36] im Zellkern ge-

bunden^[37] und in die entsprechende miRNA geschnitten.^[35] Anschließend wird die miRNA durch den Transporterkomplex Exportin-5-RanGTP^[38] aus dem Zellkern in das Zellplasma transportiert, um dort vom *Dicer* weiter prozessiert zu werden.^[39]

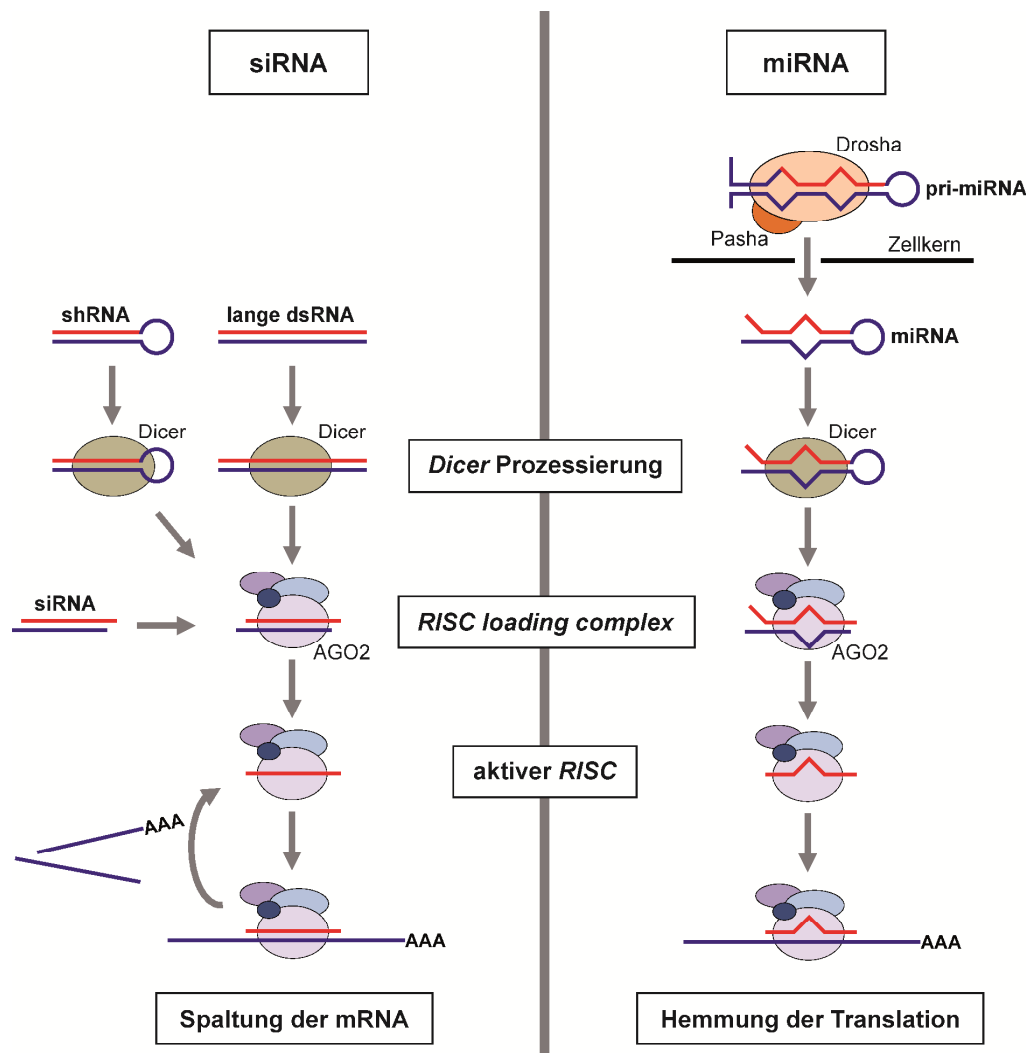


Abbildung 1.2: Posttranskriptionale Genregulation durch siRNA und miRNA. siRNA wird in die Zelle transfiziert oder innerhalb der Zelle durch *Dicer*-Prozessierung von langer dsRNA oder shRNA generiert. Die siRNA wird anschließend durch den *RISC loading complex* gebunden. Das darin enthaltene Argonaut-Protein AGO2 spaltet den *sense*-Strang der siRNA, was zur Ausbildung des aktiven *RISC* führt. Der *antisense*-Strang innerhalb des aktiven *RISC* ermöglicht die Sequenz-spezifische Adressierung einer mRNA, welche nach der Hybridisierung mit dem *antisense*-Strang durch das AGO2-Protein gespalten wird. Nach der Dissoziation der gespaltenen mRNA vom aktiven *RISC* ist dieser zur erneuten Adressierung einer mRNA in der Lage. miRNA wird innerhalb des Zellkerns durch einen Proteinkomplex aus den Proteinen Drosha und Pasha generiert. Nach dem Transport in das Zellplasma wird diese auch durch das *Dicer*-Enzym prozessiert und vom *RISC loading complex* gebunden. Die Aktivierung des *RISC* führt ebenfalls zur Sequenz-spezifischen Adressierung einer mRNA. Dabei wird diese allerdings nicht geschnitten, sondern lediglich deren Translation gehemmt.

Die Endoribonuklease *Dicer* ist Teil eines Proteinkomplexes mit diversen Kofaktoren^[40] und schneidet sequenzunabhängig dsRNA^[15a] im Abstand von 21 Basen ausgehend vom 3'-Überhang.^[1c] Die Kofaktoren besitzen dsRNA-Bindungsdomänen und helfen bei der Interaktion des *Dicers* mit verschiedenen Typen von dsRNA,^[41] wodurch auch dsRNA ohne Überhang bzw. mit 5'-Überhang akzeptiert werden kann.^[1c] Der *Dicer* selbst besteht aus einer dsRNA-Bindungsdomäne (dsRBD),^[1c] zwei RNase III Domänen und einer PAZ-Domäne.^[40, 42] Die PAZ-Domäne enthält eine hydrophobe Tasche, welche dsRNA mit zwei Nukleotid-Überhängen am 3'-Ende erkennt^[1c, d] und ist neben der dsRBD-Domäne für die

Bindung der dsRNA verantwortlich. Die beiden RNase III Domänen schneiden je einen Strang der dsRNA durch Hydrolyse der Phosphordiester^[43] zur resultierenden siRNA bzw. miRNA.^[1d]

Nach Prozessierung durch den *Dicer* wird die siRNA bzw. miRNA über den *RISC loading complex* (RLC)^[44] in den inaktiven *RISC* übertragen.^[1c, 45] Essentiell für die Aufnahme in den *RISC* ist dabei neben der Länge des Duplexes^[29b, 46] eine Phosphat-Gruppe am 5'-Ende des *antisense*-Strangs.^[47] Die Anwesenheit dieser 5'-Phosphat-Gruppe wird durch die Hydrolyse des Phosphordiesters der RNA durch den *Dicer* gewährleistet.^[1c, d] Bei synthetischer siRNA erfolgt die Phosphorylierung durch die Kinase Clp1.^[48] Die Stabilität des Duplexes an den 5'-Enden entscheidet im nächsten Schritt über die Zuordnung von *sense*-Strang und *antisense*-Strang.^[49] Dabei nimmt der RNA-Strang, dessen 5'-Ende weniger stabil paart, die Rolle des *antisense*-Strangs ein.^[50] Diese Unterscheidung der Duplex-Stabilität wird durch den *Dicer*^[29b] und die Kofaktoren des *Dicers* gewährleistet.^[49]

Das Konzept des *RISC* mit einem Argonaut-Protein (AGO2) als Schlüsselkomponente wurde als erstes von *Fire*^[51] vorgeschlagen und später von *Tuschl*^[1a, b] und *Hannon*^[52] experimentell bewiesen. Der *RISC* ist ein Multiproteinkomplex von 140 bis 500 kDa dessen Bestandteile noch nicht vollständig identifiziert und charakterisiert wurden.^[43] Das darin enthaltene AGO2-Protein enthält ein RNase H Strukturmotiv^[53] und spaltet somit Phosphodiester in RNA/RNA und RNA/DNA Duplexen. Es setzt sich zusammen aus einer PAZ-Domäne und einer PIWI-Domäne, welche sich in eine Subdomäne Mid/A und PIWI/B aufteilen lässt.^[47c, 53-54] Die PAZ-Domäne ist strukturell der PAZ-Domäne des *Dicer* sehr ähnlich und ist ebenfalls für die Erkennung von kurzer dsRNA mit zwei Nukleotid-Überhängen am 3'-Ende verantwortlich.^[54-55] Der *antisense*-Strang wird über das 3'-Ende mit dieser PAZ-Domäne^[47b, 55] und über das 5'-Phosphat mit der Bindetasche der Mid/A Subdomäne^[56] in den *RISC* geladen. Die PIWI/B enthält das RNase H Strukturmotiv und ist somit verantwortlich für die Spaltung der mRNA.^[53] Man geht davon aus, dass der *sense*-Strang nach der Zuordnung durch das RNase H Strukturmotiv geschnitten wird und anschließend vom Proteinkomplex dissoziiert,^[57] um letztendlich den aktiven *RISC* auszubilden.^[45]

Der aktivierte *RISC* adressiert anschließend die korrespondierende mRNA.^[29a] Die Positionen zwei bis acht ausgehend vom 5'-Ende des *antisense*-Strangs innerhalb des *RISC* sind dabei für die sequenzspezifische Erkennung der mRNA verantwortlich.^[58] Diese Erkennungsregion wird allgemein als *seed region* bezeichnet (Abbildung 1.1). Die mRNA wird nach Assoziation an den *RISC* zwischen Position 10 und 11 bezüglich des 5'-Endes des *antisense* Stranges durch das RNase H Strukturmotiv der PIWI/B Subdomäne geschnitten.^[29, 59] Nach der Spaltung ist die mRNA nicht länger durch eine Cap-Struktur am 5'-Ende und eine Poly-Adenosin Sequenz am 3'-Ende geschützt und wird durch RNasen abgebaut.^[16] Der *RISC* kann nach Dissoziation der gespaltenen mRNA aus dem Komplex wiederholt eine mRNA adressieren und schneiden.^[25]

miRNA wird ebenfalls nach Prozessierung durch den *Dicer* in den *RISC* geladen^[15b, 60] und die entsprechende mRNA mittels des *antisense*-Strangs sequenzspezifisch adressiert.^[29a] Die mRNA wird dabei allerdings nicht gespalten sondern lediglich deren Translation unterdrückt.^[30] Dieser entscheidende Aktivitäts-Unterschied zwischen siRNA und miRNA wird innerhalb des *RISC* reguliert: Erst eine vollständige Basenpaarung mit der mRNA ermöglicht deren katalytische Spaltung,^[59a, 61] da die Ribonuklease-Aktivität des AGO2-Proteins durch die Ausbildung einer A-Form Helix gesteuert wird.^[62] Die helikale Geometrie einer A-Form Helix der RNA ist somit der bestimmende Faktor für den Wirkmechanismus der RNA-Interferenz.^[62a, 63]

1.1.2 Chemische Modifikation von siRNA

In der Vergangenheit wurden zahlreiche Ansätze verfolgt, um die Effektivität von transfizierter siRNA für therapeutische und wissenschaftliche Anwendungen zu erhöhen (Abbildung 1.3). Dabei verfolgt der Einsatz von chemischen Modifikationen vor allem die Erhöhung der Stabilität der siRNA. Neben der thermodynamischen Stabilität liegt der Fokus dabei auf der Steigerung der Nuklease-Resistenz, da siRNA *in vitro* und *in vivo* eine sehr begrenzte Lebensdauer aufweist.^[64] So ergab die intravenöse Injektion von nackter siRNA in Ratten eine *in vivo* Halbwertszeit von sechs Minuten.^[65] Allerdings führen Modifikationen innerhalb der siRNA leicht zu einer Störung der A-Form Helix Geometrie und beeinträchtigen dadurch, wie im vorigen Abschnitt aufgeführt, die Aktivität des aktiven *RISC*.^[47c, 54] Modifikationen innerhalb des *antisense*-Strangs haben daher meist einen negativen Einfluss auf die resultierende Effektivität der siRNA. Dies gilt speziell für die *seed region* am 5'-Ende^[66] und die Spaltstelle an Position zehn und elf.^[46b] Eine Modifikation des *antisense*-Strangs am 5'-Ende kann darüber hinaus auch die Phosphorylierung an dieser Position beeinträchtigen, welche essentiell für die Erkennung der siRNA durch den *RISC* ist.^[62a, 67] Das 3'-Ende beider Stränge der siRNA toleriert hingegen Modifikationen generell ohne Verlust an Aktivität.^[61-62, 67] Deshalb werden an dieser Stelle oft dT-Überhänge verwendet, da diese die Nuklease-Stabilität erhöhen und darüber hinaus kostengünstiger als RNA Nukleotide sind.^[46b, 68]

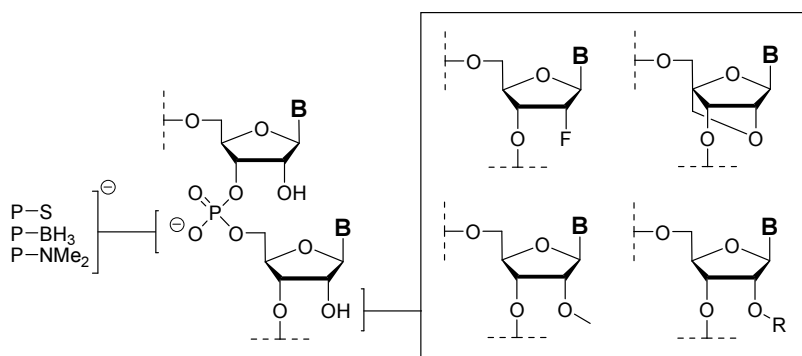


Abbildung 1.3: Chemische Modifikationen von siRNA. 2'-Ribose Modifikationen: 2'-Fluoro-Nukleoside, 2'-4'-verbrückte Nukleoside (LNA), 2'-Methoxy-Nukleoside und 2'-Alkyl-Nukleoside. Phosphat-Modifikationen: Phosphorthioate, Boranophosphate und Phosphordiamidate. R = Alkyl.

Zur chemischen Modifikation der siRNA eignet sich neben dem Phosphat-Rückgrat vor allem die 2'-Hydroxygruppe der Ribose, da deren Anwesenheit innerhalb des aktiven *RISC* nicht zwingend notwendig ist^[63a] und der *RISC* bezüglich dieser Position generell eine hohe Toleranz aufweist.^[43] Unter den derzeitigen Modifikationen stellen 2'-Fluoro Nukleoside äußerst attraktive Kandidaten dar, da diese die Stabilität und die Nuklease-Resistenz der siRNA erhöhen und gleichzeitig weitgehend durch den *RISC* toleriert werden.^[64, 69] Ebenfalls äußerst vielversprechende Kandidaten stellen verbrückte Modifikationen mit einer Methylengruppe zwischen der 2'- und der 4'-Position dar. Diese sogenannte *locked nucleic acid* (LNA) besitzt derzeit den größten stabilisierenden Effekt und wird gut durch den *RISC* toleriert.^[69a, 70] Partielle Modifikation der siRNA mit 2'-Methoxy Nukleosiden führt ebenfalls zu einer gesteigerten Stabilität und einer erhöhten Nuklease-Resistenz.^[62d, 64, 71] Allerdings bewirkt hier die vollständige Modifikation der siRNA den kompletten Verlust der Aktivität.^[69a] Sterisch anspruchsvollere 2'-O-alkylierte Modifikationen verursachen meist eine ausgeprägte Störung der A-Helix Geometrie der siRNA und haben deshalb nur geringes Potential.^[69a]

Die Modifikation des Phosphat-Rückgrats der siRNA erfolgt meist durch Phosphorthioate,^[68] da diese die Nuklease-Resistenz der siRNA deutlich steigern ohne dabei die Aktivität zu beeinflussen.^[62d, 69a] Allerdings konnte Phosphorthioaten eine gewisse Cytotoxizität nachgewiesen werden.^[62d, 72] Boranophosphate bewirken im Vergleich zu Phosphorthioaten die doppelte Steigerung der Nuklease-Resistenz und besitzen eine wesentlich geringere Toxizität als Phosphorthioate.^[69b] Ihr Einsatz hat sich bisher jedoch nicht durchgesetzt. Phosphoramidate haben sich auf Basis von *antisense*-Oligonukleotiden als äußerst Nuklease-resistent erwiesen.^[73] Ihre Toleranz durch den *RISC* wurde allerdings nicht eingehend untersucht und ist Gegenstand derzeitiger Studien.^[74]

1.2 Transport von siRNA

Hinsichtlich ihrer therapeutischen Anwendung besitzt siRNA gegenüber gewöhnlichen Arzneimitteln den großen Vorteil, dass sich mit ihrer Hilfe prinzipiell jedes Gen regulieren lässt.^[3] siRNA wurde daher als die nächste Generation von Arzneimitteln angesehen und versprach speziell bei Enzymen, welche sich nicht direkt durch kleine Moleküle inhibieren lassen, großen therapeutischen Nutzen. Trotz dieses enormen Potentials ist der klinische Erfolg von siRNA bisher allerdings gering.^[75] Eine der größten Hürden ist der Transport der siRNA in die Zelle,^[4] da siRNA aufgrund der negativen Ladung und der Größe die Zellmembran nicht durchdringen kann.^[5] Prinzipiell lässt sich siRNA entweder indirekt, oder direkt in Zellen transportieren. Diese beiden Strategien werden im folgenden Text vorgestellt.

1.2.1 Indirekter Transport von siRNA

Im Fall des indirekten Transports wird anstelle der siRNA ein Plasmidvektor in die Zelle eingeschleust, der anschließend eine shRNA exprimiert. Diese shRNA wird dann durch den *Dicer* zur entsprechenden siRNA prozessiert.^[76] Der große Unterschied zur direkten Transfektion von siRNA liegt darin, dass die RNA-Interferenz durch die wiederholte Transkription der shRNA mehrere Monate aufrechterhalten bleibt.^[77] Der indirekte Transport könnte daher speziell bei der Behandlung von chronischen Krankheiten Anwendung finden, da hier eine Genregulation über einen längeren Zeitraum notwendig ist.^[78] Als Transportsysteme werden meist Viren verwendet, da diese als biologische Experten für die Transfektion von genetischem Material die höchste Transfektions-Effektivität aufweisen. Dieses Konzept wurde 2002 von mehreren Forschungsgruppen gleichzeitig vorgestellt^[79] und bis heute auf fünf verschiedene Viren als Transportsysteme erweitert: Retroviren, Lentiviren, Adenoviren, Adeno-Assoziierte-Viren und Baculoviren.^[80] Allerdings sind Viren in ihrer Wirkung schwer berechenbar und bergen immunogene^[81] und mutagene^[82] Risiken. Diese Risiken lassen sich durch nicht-virale Transportsysteme auf Kosten der Effektivität minimieren.^[83] Die Langzeitwirkung der RNA-Interferenz lässt sich jedoch nicht unterdrücken und verhindert dadurch eine gezielte Anwendung mit transienter Wirkung. Aus diesen Gründen hat sich der indirekte Transport von siRNA gegenüber dem direkten Transport bisher nur in speziellen Anwendungen durchgesetzt.^[3, 5b, 6b, c, 76a]

1.2.2 Direkter Transport von siRNA

Der direkte Transport von siRNA in die Zelle kann mit Hilfe von mechanischen Methoden, Nanopartikeln, kationischen Polymeren, kationischen Lipiden oder durch Liganden-Konjugate erfolgen. Dabei bieten mechanische Ansätze allerdings nur begrenzte Anwendungsmöglichkeiten. Neben Nukleofektion und Elektroporation,^[84] welche ausschließlich *in vitro* Anwendung finden, lässt sich siRNA mechanisch auch durch intravaskuläre Injektion^[85] in Zellen transportieren. Dabei wird eine große Menge siRNA unter hohem Druck injiziert und verursacht so eine Störung der Membranintegrität der Zellen, wodurch die siRNA durch diese diffundieren kann.^[86] Diese Methode konnte bereits erfolgreich bei Mäusen angewendet werden.^[87] Allerdings lässt sie sich nicht auf den Menschen übertragen, da man Injektions-Volumina von mehreren Litern benötigen würde.^[80]

Hinsichtlich künftiger Einsatzmöglichkeiten bei therapeutischen Anwendungen konzentrieren sich derzeitige Forschungsansätze daher hauptsächlich auf Nanopartikel, kationische Polymere, kationische Lipide und Liganden-Konjugate. Diese Ansätze sind in Abbildung 1.4 schematisch dargestellt.

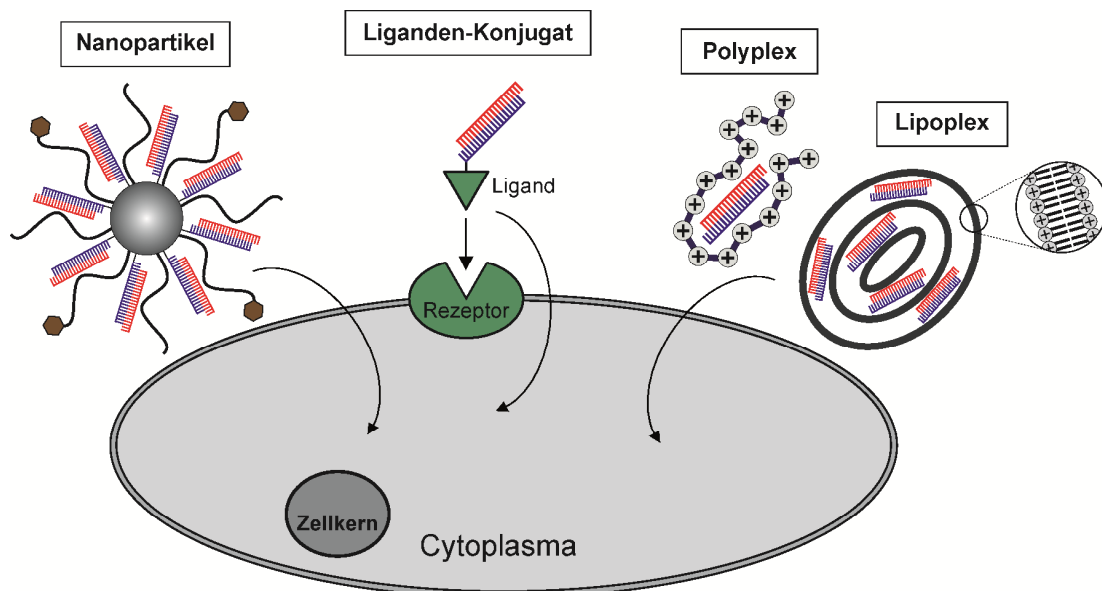


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung diverser Strategien des direkten Transports von siRNA in Zellen.

Nanopartikel zeichnen sich als Transportsysteme für siRNA neben ihrer hochgradigen Stabilität und enzymatischen Resistenz vor allem durch die dichte Funktionalisierbarkeit ihrer Oberfläche aus.^[88] Als Nanopartikel dienen anorganische Nanopartikel,^[89] Micellen,^[90] und Quantum Dots.^[91] Darüber hinaus ermöglichen auch Nanopartikel auf Lipidbasis^[92] den direkten Transport von siRNA. Diese stabilen Nukleinsäure-Lipid Partikel (SNALP) besitzen einen Durchmesser von ca. 100 nm und bestehen aus stabilisierten Liposomen mit einer PEG-Hülle in deren Kern die siRNA eingelagert ist.^[6a] Trotz ihrer hohen Effektivität sind Nanopartikel aufgrund ihrer mutagenen und cytotoxischen Wirkung derzeit jedoch nur begrenzt einsetzbar.^[93] Darüber hinaus können chronische Risiken durch ihre ausgeprägte Stabilität nur schwer abgeschätzt werden.^[93]

Ein effektiver und gut erforschter Ansatz für den direkten Transport von siRNA ist die Komplexierung der negativ geladenen siRNA mit einem kationischen Polymer zur Ausbildung eines sogenannten

Polyplexes.^[94] Als kationische Polymere dienen lineare und verzweigte Polyethylenimine (PEI), Poly-L-Lysin (PLL), Chitosan oder Polyamidoamine (PAMAM) (Abbildung 1.5),^[95] wobei sich Polyethylenimine als effektivste Polymere zur Transfektion von siRNA erwiesen haben.^[96] Die Effektivität der Polyethylenimine begründet sich in deren hoher kationischer Ladungsdichte aufgrund der Vielzahl an Aminen, welche je nach pH-Wert protoniert vorliegen (20 % bei pH = 7.4).^[97] Durch diese hohe Ladungsdichte können Polyethylenimine die negativ geladene siRNA zu sehr dichten Partikeln komplexieren. Die insgesamt positive Ladung ermöglicht eine Interaktion mit der negativ geladenen Zellmembran, unterdrückt die Aggregation einzelner Partikel aufgrund elektrostatischer Abstoßung und verbessert zudem deren Löslichkeit in wässrigem Milieu.^[98] Dies bewirkt eine effektive Transfektion und darüber hinaus eine nahezu vollständige Abschirmung der siRNA gegenüber Nukleasen.^[99]

Nach der Interaktion mit der negativen Zellmembran wird der Polyplex mittels Endozytose durch die Zelle aufgenommen und nutzt innerhalb der Zelle den so genannten „Protonenschwamm-Effekt“, um aus dem Endosom zu entweichen und die siRNA in das Cytosol freizusetzen.^[96a] Dabei führt das saure Milieu des Endosoms zu einer zusätzlichen Protonierung der Amine und bewirkt dadurch einen Protonenfluss in das Endosom. Dieser Protonenfluss verursacht wiederum den Zufluss von Chlorid-Ionen zum Ladungsausgleich und den Zufluss von Wasser, um den osmotischen Druck auszugleichen. Letztendlich führt dies zum Anschwellen bzw. zum Platzen des Endosoms, wodurch die transportierte siRNA freigesetzt wird.^[100] Neben ihrer Effektivität weisen sämtliche Polyplexe jedoch eine hohe Cytotoxizität auf, was ihren therapeutischen Einsatz stark einschränkt.^[93, 101]

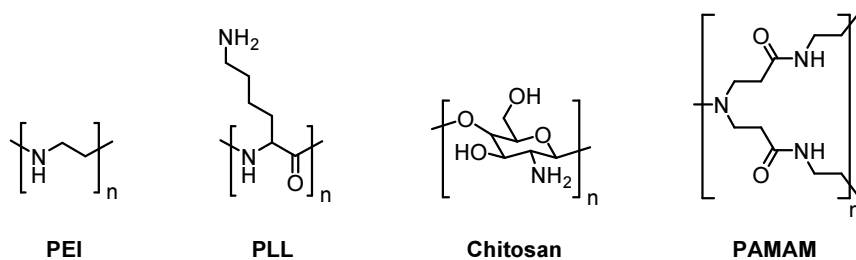


Abbildung 1.5: Kationische Polymere Polyethylenimin (PEI), Poly-L-Lysin (PLL), Chitosan und Polyamidoamin (PAMAM) zur Komplexierung von siRNA zu Polyplexen.

Neben der Komplexierung mit kationischen Polymeren stellt die Komplexierung mit kationischen Lipiden eine ebenfalls intensiv erforschte und effektive Strategie des direkten Transports von siRNA dar. Dabei interagiert die siRNA mit einem Liposom aus kationischen Lipiden zur Ausbildung einer multilamellaren Struktur aus positiv geladenen Lipiddoppelschichten unter Einlagerung der negativ geladenen siRNA.^[102] Diese so genannten kationischen Lipoplexe interagieren analog zu den kationischen Polyplexen mit der negativ geladenen Zellmembran und werden ebenfalls mittels Endozytose in die Zellen aufgenommen.^[103] Nach der Aufnahme führt die Wechselwirkung der kationischen Lipide des Lipoplexes mit den anionischen Lipiden des Endosoms über einen Ladungsaustausch zur Freisetzung der siRNA.^[104] Kommerziell zur Transfektion von siRNA genutzte kationische Lipide sind u.a. DOTMA, DOSPA und DC-Chol (Abbildung 1.6). Jedoch haben sich kationische Lipoplexe sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als cytotoxisch erwiesen^[93b] und führten neben einer beeinträchtigten Genexpression^[101d] zur verstärkten Immunantwort der Zellen.^[105]

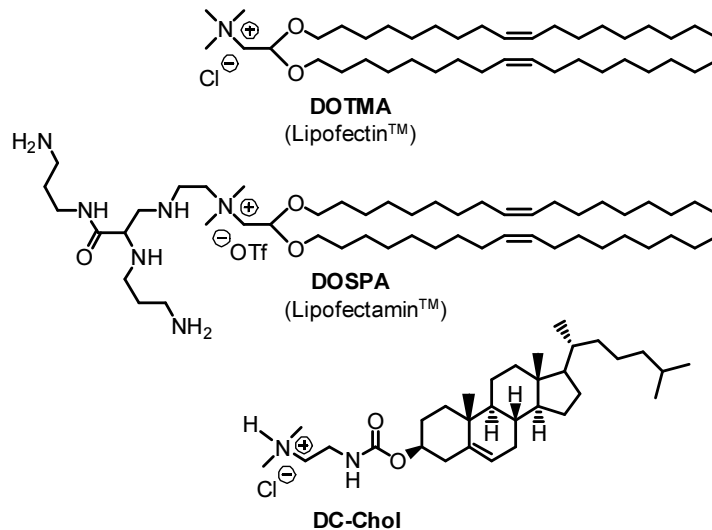


Abbildung 1.6: Kationische Lipide DOTMA (*N*-[1-(2,3-Dioleyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammoniumchlorid), DOSPA (2,3-Dioleyloxy-*N*-[2(spermincarboxamido)ethyl]-*N,N*-dimethyl-1-propanaminium-trifluoroacetat) und DC-Chol ([*N*-(*N,N'*-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]cholesterol-hydrochlorid) zur Einlagerung von siRNA in Lipoplexen.

Sowohl bei Polyplexen als auch bei Lipoplexen führt die positive Ladung zu einer gänzlich unspezifischen Aufnahme in die Zellen.^[106] Hinsichtlich therapeutischer Anwendungen stellt diese Unspezifität neben der ausgeprägten Toxizität^[93, 105b] den größten Nachteil dieser Strategien dar, da *in vivo* die effektive und sichere Regulation eines Gens nur durch eine Zell-spezifische Aufnahme der siRNA gewährleistet werden kann.^[5b, 6] Ein vielversprechender Lösungsansatz des spezifischen und nicht-toxischen Transports von siRNA stellt deren Modifikation mit einem Rezeptor-Liganden dar, um die siRNA durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zelle zu transportieren. Dieser Ansatz wird im folgenden Abschnitt detailliert vorgestellt.

1.3 siRNA Liganden-Konjugate

Die Rezeptor-vermittelte Aufnahme von siRNA konnte bereits mit diversen Liganden-Konjugaten erfolgreich durchgeführt werden. Als Liganden zur Modifikation der siRNA dienten dabei Saccharide, Lipide, Steroide, Vitamine, Peptide und Aptamere. Unter diesen siRNA-Konjugaten stellt die von Vornlocher^[107] vorgestellte Cholesterol-siRNA derzeit das wohl erfolgreichste Liganden-Konjugat dar. Es findet als *Accell siRNA* von *Dharmacon* bereits kommerzielle Anwendung.

Der folgende Abschnitt gibt eine Übersicht über die unterschiedlichen siRNA-Konjugate mit Bezug auf das jeweilige Rezeptor-Liganden-System. Neben der Genregulation *in vitro* konnten einige dieser Konjugate bereits erfolgreich *in vivo* eingesetzt werden. Da sich siRNA nach intravaskulärer Injektion in den Blutkreislauf jedoch verstärkt in der Leber anreichert und von dort entweder über Nierenfiltration in den Urin oder über die Gallenblase in den Darm ausgeschieden wird,^[108] beschränken sich diese *in vivo* Anwendungen meist auf Genregulationen innerhalb der Leber.

1.3.1 Saccharid-modifizierte siRNA

Saccharid-Modifikationen stellen vielversprechende Kandidaten zur gezielten Adressierung von Zellen dar, da die Interaktionen zwischen Sacchariden und Saccharid-bindenden Rezeptoren an der Zelloberfläche (Lektinen)^[109] eine zentrale Rolle bei der Zellerkennung einnehmen.^[110] Diese hochspezifischen Interaktionen wurden bereits erfolgreich als Transportsystem (*glycotargeting*)^[111] zur gezielten Aufnahme von Saccharid-modifizierten Wirkstoffen und Oligonukleotiden ausgenutzt.^[112] In der Natur erfolgen Saccharid-Lektin-Interaktion gewöhnlich durch Mehrfach-Saccharide, da die Wechselwirkungen nur schwach ausgeprägt sind (*glycocluster effect*).^[113] Daher werden beim *glycotargeting* meist ebenfalls verzweigte Strukturen mit mehreren Saccharid-Modifikationen verwendet, um die Interaktion der Konjugate mit den zellulären Rezeptoren zu verbessern.^[114]

Die erfolgreiche Aufnahme von Saccharid-modifizierter siRNA wurde bisher von *Mahato*,^[115] *Wolff*,^[116] *Kataoka*^[117] und *Eritja*^[118] beschrieben, wobei in nahezu allen Ansätzen der Asialoglycoprotein-Rezeptor adressiert wurde. Der Asialoglycoprotein-Rezeptor ist verstärkt auf Leber-Epithelzellen (z.B. Hepatozyten) exprimiert und dient in der Natur der Erkennung von Galactose-^[119] oder Lactose-^[120] funktionalisierten Proteinen. Bei den verwendeten siRNA-Konstrukten wurden die Saccharid-Liganden allerdings, mit Ausnahme von *Eritja*,^[118] über ein Polymer mit der siRNA verbunden. Somit stellen diese Konstrukte keine klassischen Liganden-Konjugate dar, sondern können als Hybridstrukturen zwischen einem Nanopartikel und einem Liganden-Konjugat interpretiert werden.

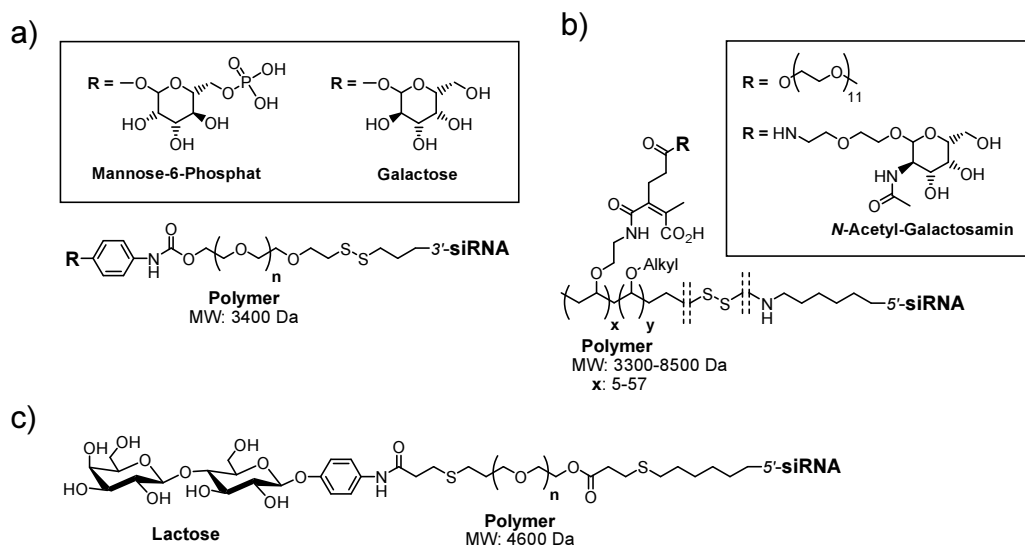


Abbildung 1.7: a) Galactose- und Mannose-6-Phosphat-siRNA Polymere von *Mahato*,^[115] b) *Dynamic PolyConjugate* von *Wolff*,^[116] c) Lactose-siRNA Polymer von *Kataoka*.^[117]

Mahato konnte erstmals zeigen, dass sich ein Galactose-funktionalisiertes DNA-25mer *in vivo* innerhalb der Hepatozyten von Ratten anreicherte und interpretierte dies als erfolgreiche Rezeptor-vermittelte Endocytose des Konjugats über den Asialoglycoprotein-Rezeptor.^[121] Die Funktionalisierung der DNA erfolgte dabei über ein Galactose-Polyethylenglykol (MW: 3400 Da). Auf Basis dieser Erkenntnisse gelang *Mahato* die *in vitro* Aufnahme von siRNA über den Asialoglycoprotein-Rezeptor in Hepatozyten-Zellen HepG2.^[115] Dabei wurde die siRNA analog zur DNA durch ein Galactose-Polyethylenglykol (MW: 3400 Da) funktionalisiert. Neben Galactose als Saccharid-Ligand verwendete

Mahato zusätzlich Mannose-6-Phosphat (M6P), da er im Rahmen interner Studien eine verstärkte Aufnahme dieses Saccharids bei hepatischen Sternzellen HSC-T6 beobachten konnte. Mannose-6-Phosphat bindet dabei an den M6P/IGF2-Rezeptor. Um eine Freisetzung der siRNA vom Polymer innerhalb des reduktiven Milieus des Cytoplasmas zu ermöglichen,^[122] wurde die siRNA am 3'-Ende des *sense*-Strangs über ein Disulfid mit dem jeweiligen Polymer verbunden. Abbildung 1.7a zeigt die Strukturen der verwendeten Galactose- und Mannose-6-Phosphat-siRNA Polymere. Die Regulationsfähigkeit der aufgenommenen siRNA wurde anhand eines Luciferase-Reportersystems quantifiziert, welches zuvor mittels Plasmid-Transfektion in die Zellen eingeführt wurde. Hinsichtlich der Regulationsfähigkeit erwiesen sich die Galactose- sowie die Mannose-6-Phosphat-siRNA Polymere in den jeweiligen Zelllinien als ähnlich effektiv. So bewirkten beide Polymere eine konzentrationsabhängige Regulation der Luciferase-Expression mit einer maximalen Reduktion um 40 %. Die Transfektion der siRNA mit einem kommerziellen Polyplex führte in beiden Zelllinien bereits bei einem Viertel der siRNA-Konzentration zu einer Reduktion der Luciferase-Expression um 90 %.

Wolff etablierte ein so genanntes *Dynamic PolyConjugate* (Abbildung 1.7b), um damit ebenfalls Hepatocyten über den Asialoglycoprotein-Rezeptor zu adressieren.^[116] Dabei funktionalisierte *Wolff* ein amphiphiles Polyvinylether-Polymer (MW: 3300-8500 Da) über eine säurelabile Maleamid-Bindung mit *N*-Acetyl-Galactosamin und einem Polyethylenglykol. Die Maleamide sollten nach Rezeptor-vermittelter Endocytose innerhalb des sauren Endosoms gespalten werden und das Endosom durch die freigesetzten Amine zum Platzen bringen („Protonenschwamm-Effekt“). Die siRNA wurde 5'-Ende des *sense*-Strangs über ein Disulfid an das Polymer gebunden, um eine Freisetzung vom Polymer innerhalb des reduktiven Milieus des Cytoplasmas zu ermöglichen.^[122] Mit Hilfe dieses Polymers konnte *Wolff* die Expression des Apolipoproteins B (ApoB) *in vitro* regulieren. Das *Dynamic PolyConjugate* erwies sich dabei als vergleichbar effektiv wie das kommerzielle Transfektionsreagenz si-QUEST und bewirkte eine Reduktion der ApoB-Expression um ca. 80 %. Das Polymer wurde darüber hinaus bereits erfolgreich *in vivo* eingesetzt und bewirkte bei Mäusen nach intravenöser Injektion eine Reduktion des ApoB mRNA-Levels um 76 %. Inwieweit sich die heterogene Größenverteilung und Funktionalisierung auf die cytotoxischen Eigenschaften des Polymers auswirkt, muss allerdings noch eingehender untersucht werden, da sich bei Polyethylenimininen die ausgeprägte Toxizität maßgeblich durch deren Heterogenität definiert.^[101a-c]

Kataoka verwendete ein ähnliches Saccharid-siRNA Polymer wie *Mahato* um damit *in vitro* die spezifische Aufnahme in humanen Hepatozyten-Zellen HuH-7 über den Asialoglycoprotein-Rezeptor zu ermöglichen (Abbildung 1.7c).^[117] Anstelle eines Galactose-Polyethylenglykol Polymers verwendete *Kataoka* ein Lactose-Polyethylenglykol Polymer (MW: 4600 Da) als Saccharid-Ligand zur Adressierung des Asialoglycoprotein-Rezeptors. Die siRNA wurde 5'-Ende des *sense*-Strangs über ein säurelabiles β -Thiopropionat mit dem Polymer verbunden, um eine Freisetzung innerhalb des sauren Endosoms zu ermöglichen. Die Regulationsfähigkeit der aufgenommenen siRNA wurde anhand eines Luciferase-Reportersystems quantifiziert, welches zuvor mittels Plasmid-Transfektion in die Zellen eingeführt wurde. Mit Hilfe dieses Polymers konnte *Kataoka* die Luciferase-Expression konzentrationsabhängig regulieren und erreichte eine maximale Reduktion um 55 %. Eine vergleichbare Reduktion konnte durch das kommerzielle Transfektionsreagenz OligofectamineTM bereits bei einem Zehntel der siRNA-Konzentration erreicht werden.

Eritja konnte zeigen, dass sich neben den oben aufgeführten Hybrid-Strukturen auch klassische Saccharid-Konjugate zur spezifischen Aufnahme von siRNA verwenden lassen.^[118] Dazu modifizierte *Eritja* eine siRNA am 5'-Ende des *sense*-Strangs direkt mit Galactose, um ebenfalls *in vitro* eine Aufnahme

in humanen Hepatozyten-Zellen HuH-7 über den Asialoglycoprotein-Rezeptor zu ermöglichen (Abbildung 1.8).

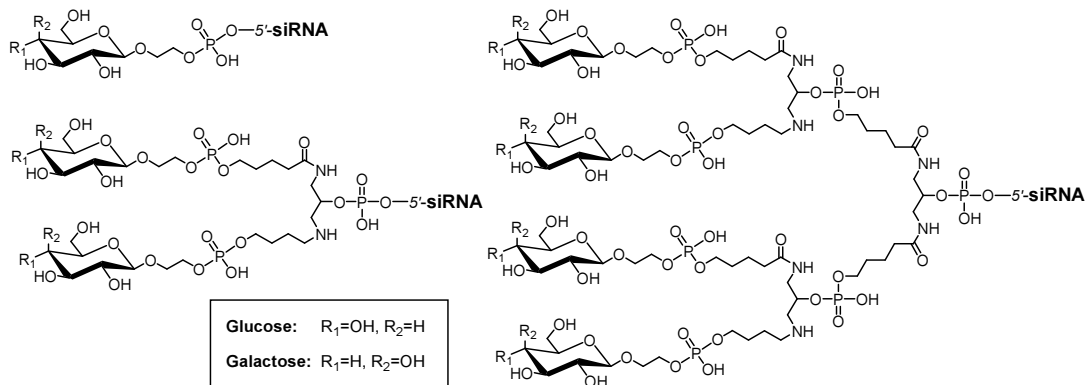


Abbildung 1.8: Verzweigte Glucose- und Galactose-modifizierte siRNA-Konjugate von *Eritja*.^[118] Durch Modifikation mit Glucose konnte keine Aufnahme in die Zellen beobachtet werden.

Neben mono-galactosylierter siRNA verwendete *Eritja* di- und tetra-galactosylierte siRNA, um dadurch die Interaktion der Konjugate mit den zellulären Rezeptoren zu verbessern (*glycocluster effect*). Mit Hilfe dieser Konjugate ließ sich die Expression des Tumor Nekrosefaktor-Proteins TNF- α in humanen Hepatozyten-Zellen HuH-7 erfolgreich regulieren. Allerdings bewirkten die Konjugate lediglich eine maximale Reduktion der Expression um 25 %. Darüber hinaus konnte bei den mehrfach-galactosylierten Konjugaten keine erhöhte Aktivität gegenüber dem einfach-galactosylierten Konjugat festgestellt werden. Neben diesen Galactose-modifizierten siRNA-Konjugaten verwendete *Eritja* ebenfalls Glucose-modifizierte siRNA-Konjugate, um dadurch eine Aufnahme in HeLa-Zellen zu ermöglichen (Abbildung 1.8). Hier konnte jedoch keinerlei Regulation des Tumor Nekrosefaktor-Proteins TNF- α beobachtet werden. Diese Beobachtung deckt sich mit den Resultaten einer weiteren Studie von *Eritja*. Hier konnte bei Verwendung eines tetra-glycosylierten DNA-25mers, welches zusätzlich durch den Fluorophor Alexa 488 modifiziert wurde, keine Internalisierung in HeLa-Zellen detektiert werden.^[114b] Allerdings führte die Funktionalisierung der DNA mit Glucose zu einer erhöhten Adsorption an der Zelloberfläche der HeLa Zellen.

1.3.2 Steroid/Lipid-modifizierte siRNA

Aufgrund ihres hydrophoben Charakters wurden Steroide und Lipide bereits zur Modifikation von *antisense*-Oligonukleotiden eingesetzt, um dadurch deren Aufnahme in Zellen zu ermöglichen.^[123] Neben diversen Lipiden konnte jedoch ausschließlich im Fall von Cholesterol eine verbesserte Aufnahme beobachtet werden. *Cook* konnte zeigen, dass dabei nicht der hydrophobe Charakter des Cholesterols ausschlaggebend für die erfolgreiche Aufnahme war.^[123] So führte Cholesterol-modifizierte *antisense*-DNA zu einer effektiven *in vitro* Regulation, wohingegen *cis*-Eicosanoyl- und Dipalmitylglyceryl-modifizierte *antisense*-DNA nahezu keinerlei Regulation bewirkten. Durch *HPLC*-Analyse konnte den *cis*-Eicosanoyl- und Dipalmitylglyceryl-Konjugaten allerdings eine wesentlich ausgeprägtere Hydrophobizität zugeordnet werden als dem Cholesterol-Konjugat. Diese Diskrepanz zwischen Effektivität der Aufnahme und Hydrophobizität ließ auf einen aktiven Transport im Fall des Cholesterol-Konjugats schließen. *Cook* interpretierte diese Resultate als Rezeptor-vermittelte Aufnahme des

Cholesterol-Konjugats über den LDL-Rezeptor (*Low Density Lipoprotein* Rezeptor). Der LDL-Rezeptor dient in der Natur der Aufnahme von Cholesterol-funktionalisierten Lipoproteinen mittels Clathrin-vermittelter Endocytose und wird auf nahezu allen Zelloberflächen exprimiert.^[124]

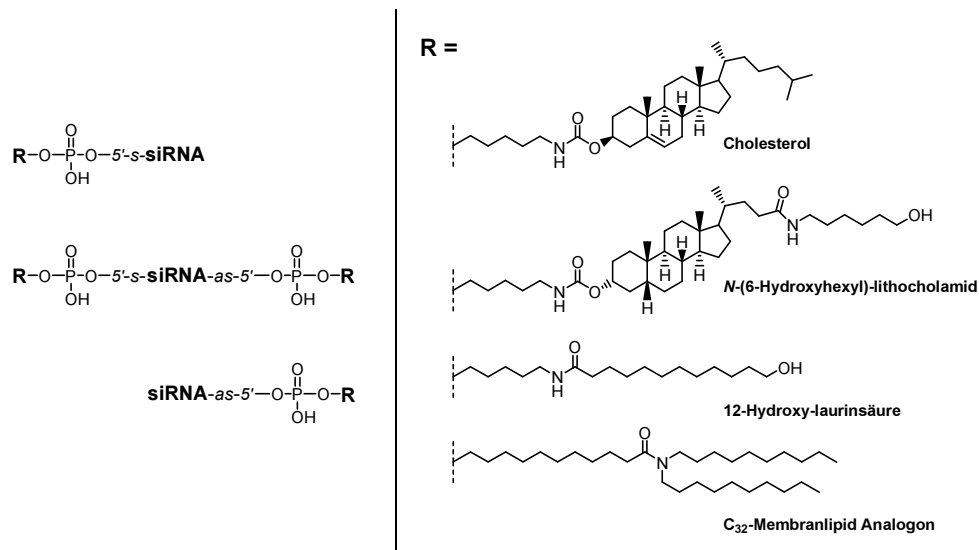


Abbildung 1.9: Steroid- und Lipid-modifizierte siRNA-Konjugate von *Vornlocher* und *Unverzagt*.^[125]

Cholesterol-modifizierte siRNA wurde erstmals von *Vornlocher* und *Unverzagt* vorgestellt.^[125] Die Modifikation der siRNA erfolgte dabei am 5'-Ende des *sense*-Strangs, des *antisense*-Strangs oder an beiden Strängen. Neben Cholesterol verwendeten *Vornlocher* und *Unverzagt* ein Lithocholamid-Derivat, Laurinsäure und ein C₃₂-Membranlipid Analogon zur Modifikation der siRNA, um damit *in vitro* deren Aufnahme in humanen Hepatozyten-Zellen HuH-7 zu ermöglichen (Abbildung 1.9). Mit Hilfe des Cholesterol-Konjugats ließ sich die Expression des β -Galactosidase Proteins erfolgreich regulieren. Dabei erwies sich die Modifikation am *sense*-Strang der siRNA am effektivsten und bewirkte eine maximale Reduktion der Expression um 45 %. Im Fall des Lithocholamid-Derivats und der Laurinsäure konnte nahezu keine Regulation detektiert werden. Lediglich das C₃₂-Membranlipid Analogon bewirkte eine geringfügige Regulation des β -Galactosidase Proteins.

Chernolovskaya konnte in einer umfangreichen Studie die Effektivität des Cholesterol-Konjugats untermauern.^[126] Er untersuchte die Aufnahme unterschiedlicher Lipid- und Steroid-modifizierter siRNA-Konjugate *in vitro* an den Krebszelllinien HEK293, HepG2 und KB-8-5 mittels Konfokal-Mikroskopie und Durchflusszytometrie. Neben Cholesterol verwendete *Chernolovskaya* Lithocholamid, (Z)-9-Oktadecen und Oleyl-lithocholamid zur Modifikation der siRNA am 5'-Ende des *sense*-Strangs (Abbildung 1.10). Zur Detektion der Aufnahme wurden die Duplexe zusätzlich mit Fluorescein modifiziert. Analog zu den Resultaten von *Cook* und *Unverzagt* wurde das Cholesterol-Konjugat von den verwendeten Zelllinien am effektivsten aufgenommen. Im Fall des (Z)-9-Oktadecen-Konjugats konnte bei allen Zelllinien nahezu keine Aufnahme detektiert werden. Die wesentlich effektivere Aufnahme des Cholesterol-Konjugats gegenüber dem hydrophoberen Oleyl-lithocholamid-Konjugat interpretierte *Chernolovskaya* ebenfalls als Rezeptor-vermittelte Aufnahme des Cholesterol-Konjugats über den LDL-Rezeptor.

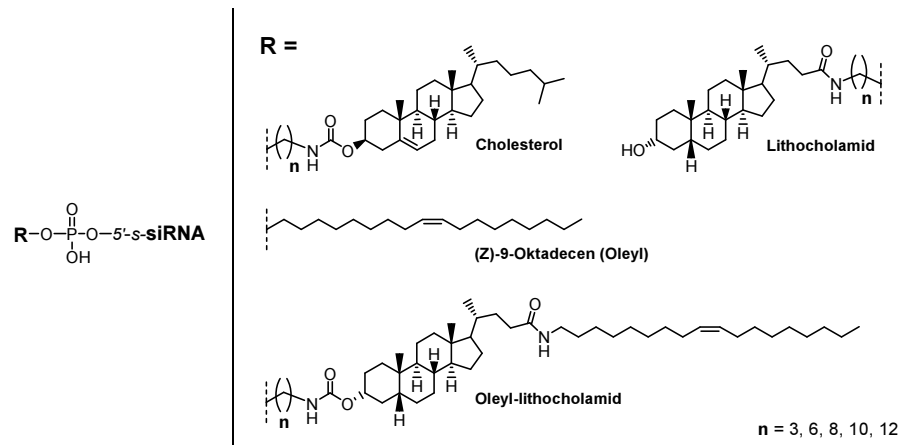


Abbildung 1.10: Steroid- und Lipid-modifizierte siRNA-Konjugate von *Chernolovskaya*.^[126]

Vornlocher optimierte das Cholesterol-siRNA Konjugat und konnte damit erstmals *in vivo* die Expression des Apolipoproteins B (ApoB) bei Mäusen regulieren.^[107] Dabei positionierte *Vornlocher* den Cholesterol-Liganden am 3'-Ende der siRNA anstelle des 5'-Endes des *sense*-Strangs zur optimalen Aktivität der siRNA und modifizierte den Duplex zusätzlich durch 2'-Methoxy Nukleoside zur verbesserten Stabilität. Zur weiteren Stabilisierung wurden die Phosphodiester der 3'-Enden durch Phosphorthioate ersetzt. Dieses optimierte Cholesterol-siRNA Konjugat (Abbildung 1.11) reicherte sich bei Mäusen nach intravaskulärer Injektion in der Leber und im Leerdarm an und bewirkte eine maximale Reduktion des ApoB mRNA-Levels um 64 %. Im Rahmen dieser Studie konnte *Vornlocher* zeigen, dass die Modifikation der siRNA mit Cholesterol zu einer verstärkten Bindung an Serum-Proteine führt und sich dadurch die pharmakokinetischen Eigenschaften der siRNA erheblich verbessern. So bewirkte die Cholesterol-Modifikation bei intravaskulärer Injektion in Mäusen eine 16-fach erhöhte Halbwertszeit sowie eine 35-fach erhöhte *Plasma Clearance* der siRNA.

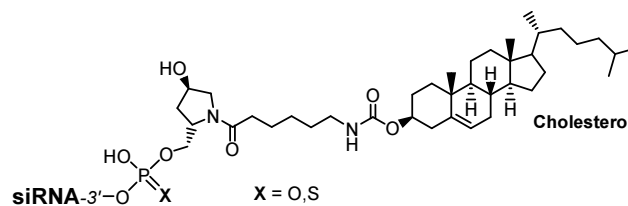


Abbildung 1.11: Optimierte Cholesterol-siRNA Konjugat von *Vornlocher*.^[107] Zur verbesserten Aktivität wurde der Cholesterol-Ligand am 3'-Ende des *sense*-Strangs positioniert. Die siRNA wurde innerhalb des Duplexes mit 2'-Methoxy Nukleosiden und an den 3'-Enden mit Phosphorthioaten stabilisiert.

Da der LDL-Rezeptor auch innerhalb des zentralen Nervensystems exprimiert wird,^[127] ermöglicht das Cholesterol-siRNA Konjugat neben der nahezu universellen Einsatzmöglichkeit *in vitro* und der *in vivo* Adressierung von Leberzellen darüber hinaus die Adressierung von Neuronen. So konnte *Aronin* bei striatalen Neuronen *in vitro* die Aufnahme von Cholesterol-siRNA mittels Konfokal-Mikroskopie nachweisen und *in vivo* durch lokale Gehirn-Injektion von Cholesterol-siRNA die Expression einer Huntigtin Mutante bei Ratten um maximal 56 % reduzieren.^[128] Die *in vivo* Adressierung von Neuronen durch Cholesterol-siRNA wurde von *Sah* bestätigt, indem er ebenfalls durch lokale Gehirn-Injektion die Expression der Phosphodiesterase CNPase in Oligodendrozyten bei Ratten um maximal 70 % reduzieren konnte.^[129] *Sah* verwendete dabei neben dem Konjugat von *Vornlocher* ein weiteres

Konjugat, bei dem das Cholesterol über ein Disulfid mit der siRNA verbunden wurde. Dieses Konjugat sollte die Freisetzung der siRNA vom LDL-Rezeptor innerhalb des reduktiven Milieus des Cytoplasmas ermöglichen^[122] und erwies sich innerhalb der von *Sah* durchgeführten Studien als nahezu doppelt effektiv hinsichtlich der Regulationsfähigkeit der Phosphodiesterase CNPase.

1.3.3 Vitamin-modifizierte siRNA

Da Vitamine für den Organismus essentiell sind und somit durch entsprechende Transportsysteme aufgenommen werden müssen, stellen diese neben Sacchariden und Steroiden ebenfalls vielversprechende Liganden zur gezielten Aufnahme von siRNA dar. Die erfolgreiche Aufnahme von Vitamin-modifizierter siRNA wurde bisher durch Konjugation mit Vitamin E (α -Tocopherol) und durch Konjugation mit Vitamin B₉ (Folsäure) beschrieben. Vitamin E (α -Tocopherol) wird aufgrund seines hydrophoben Charakters durch Lipoproteine wie Chylomikrone, LDL- und VLDL-Partikel gebunden und ebenfalls über den LDL-Rezeptor verstärkt in Leberzellen aufgenommen.^[130] Dabei hat das Vitamin den großen Vorteil, dass es selbst bei hohen Dosen nicht toxisch wirkt.^[131] Vitamin B₉ (Folsäure) wird über den Folat-Rezeptor mittels Clathrin-vermittelter Endocytose aufgenommen.^[132] Da dieser Rezeptor fast ausschließlich von Krebszellen und kaum von gesunden Zellen exprimiert wird,^[133] stellt Folsäure einen vielversprechenden Liganden zur gezielten Krebstherapie dar.^[134]

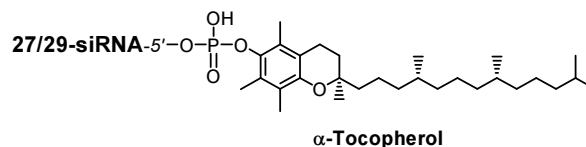


Abbildung 1.12: α -Tocopherol-modifizierte siRNA von Yokota.^[135] Die 27/29mer siRNA wird innerhalb der Zelle durch das Dicer-Enzym zur aktiven 21mer siRNA ohne α -Tocopherol-Modifikation prozessiert.

α -Tocopherol-modifizierte siRNA wurde erstmals von Yokota vorgestellt.^[135] Dabei verwendete Yokota eine 27/29mer siRNA, welche am 5'-Ende des *antisense*-Strangs mit α -Tocopherol modifiziert wurde (Abbildung 1.12). Dieses Konjugat sollte innerhalb der Zelle durch das Dicer-Enzym zur aktiven 21mer siRNA prozessiert werden.^[136] Die siRNA wurde innerhalb des Duplexes mit 2'-Methoxy Nukleosiden und an den 3'-Enden mit Phosphorthioaten stabilisiert. Mit Hilfe dieses α -Tocopherol-siRNA Konjugats ließ sich *in vitro* die Expression des Apolipoproteins B (ApoB) innerhalb hepatischer Leberzellen Hepa 1-6 regulieren und bewirkte eine maximale Reduktion der Expression um 50 %. Die Transfektion des Konjugats mit Hilfe des kommerziellen Transfektionsreagenzes Lipofektamin RNAi-MAX führte allerdings bereits bei einer 200-fach reduzierten siRNA-Konzentration zu einer Reduktion der ApoB-Expression um 90 %. Trotz dieser vermeintlich geringen Effektivität konnte Yokota mit Hilfe des α -Tocopherol-siRNA Konjugats bei Mäusen durch intravaskuläre Injektion *in vivo* das ApoB mRNA-Level innerhalb der Leber um 80 % reduzieren. Dabei ließ sich durch zusätzliche Markierung mit dem Fluorophor Cy3 eine erhöhte Anreicherung der α -Tocopherol-siRNA in den Hepatocyten der Leber detektieren.

Die erfolgreiche Regulation eines Gens durch Folsäure-modifizierte siRNA wurde bisher ausschließlich *in vitro* beschrieben und erstmals von Huang vorgestellt.^[137] Dabei verwendete Huang ähnlich wie Yokota ein siRNA-Konjugat, welches innerhalb der Zelle durch das Dicer-Enzym zur aktiven

21mer siRNA prozessiert wird (Abbildung 1.13a). Zu diesem Zweck wurde ein 17mer DNA-Einzelstrang am 5'-Ende mit Folsäure modifiziert und anschließend mit einer 21/38mer siRNA hybridisiert. Mit Hilfe dieses Folsäure-siRNA Konjugats konnte *Huang* die Expression zweier endogener Gene *in vitro* in humanen Krebszellen regulieren. So bewirkte das Konjugat in humanen Endothelzellen HUVEC eine maximale Reduktion des mRNA-Levels von α V-Integrin um 80 % und in humanen Krebszellen KB eine maximale Reduktion des mRNA-Levels von Survivin um 50 %.

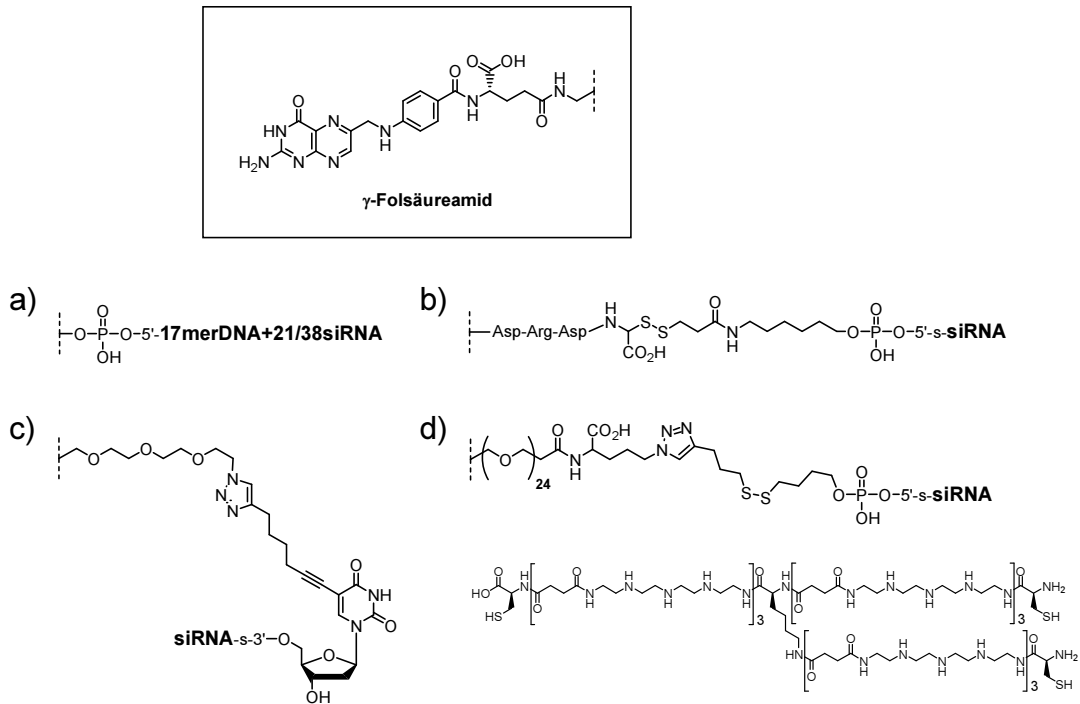


Abbildung 1.13: a) 5'-Folsäure-modifizierte 17mer DNA + 21/38mer siRNA von *Huang*,^[137] b) 5'-Folsäure-modifizierte siRNA von *Low*,^[138] c) 3'-Folsäure-modifizierte siRNA von *Carell*,^[139] d) 5'-Folsäure-modifizierter siRNA Polyplex von *Wagner*.^[140]

Das erste direkte Folsäure-siRNA Konjugat wurde von *Low* beschrieben (Abbildung 1.13b).^[138] Allerdings wurde dieses Konjugat bisher nicht zur Regulation eines Gens eingesetzt, sondern ausschließlich dessen gezielte Aufnahme in Krebszellen untersucht. Dabei wurde die Folsäure über ein Disulfid an das 5'-Ende des *sense*-Strangs der siRNA gebunden, um eine Freisetzung innerhalb des reduktiven Milieus des Cytoplasmas zu ermöglichen.^[122] Die siRNA wurde innerhalb des Duplexes vollständig mit 2'-Methoxy Nukleosiden stabilisiert und zusätzlich mit dem Fluorophor Cy5 markiert. Mittels Konfokal-Mikroskopie konnte *Low* die erfolgreiche Aufnahme des Folsäure-siRNA Konjugats *in vitro* durch die humanen Krebszellen RAW264.7 und HeLa detektieren. Darüber hinaus konnte *Low* bei Mäusen durch intravaskuläre Injektion *in vivo* die Anreicherung der Folsäure-siRNA in Tumorgewebe beobachten. Zu diesem Zweck wurde der Duplex anstelle des Fluorophors Cy5 mit dem Infrarot-Farbstoff DY647 markiert.

Wagner verwendete Folsäure-siRNA in Kombination mit einem definierten Polyethylenimin, um mit Hilfe des daraus resultierenden Polyplexes *in vitro* die Aufnahme in humanen Krebszellen KB zu ermöglichen (Abbildung 1.13d).^[140] Dabei wurde ein Folsäure-Polyethylenglykol mittels Click-Chemie an das 5'-Ende des *sense*-Strangs der siRNA gebunden. Um eine Freisetzung vom Polymer innerhalb des reduktiven Milieus des Cytoplasmas zu ermöglichen,^[122] wurde der Linker zusätzlich mit einem Disulfid modifiziert. Die Regulationsfähigkeit der aufgenommenen siRNA wurde anhand eines Luciferase-

Reportersystems quantifiziert, welches zuvor mittels Plasmid-Transfektion in die Zellen eingeführt wurde. *Wagner* konnte durch Konfokal-Mikroskopie und Durchflusszytometrie die Aufnahme des Folsäure-Konjugats in Ab- und Anwesenheit des Polyethylenimins beobachten. Allerdings ließ sich die Expression der Luciferase nur in Anwesenheit des Polyethylenimins und somit durch den Polyplex regulieren. Der Folsäure-modifizierte Polyplex bewirkte eine maximale Reduktion der Luciferase-Expression um 78 %

Das derzeit einzige direkte Folsäure-siRNA Konjugat mit regulatorischen Eigenschaften stellt das von *Johannes Harder* im Arbeitskreis *Carell* etablierte Konjugat dar (Abbildung 1.13c).^[139] Entgegen der Ansätze von *Huang*, *Low* und *Wagner* wurde die siRNA mittels Click-Chemie nicht am 5'-Ende, sondern am 3'-Ende des *sense*-Strangs mit Folsäure modifiziert, um dadurch die optimale Aktivität der siRNA zu gewährleisten. *Johannes Harder* konnte durch Konfokal-Mikroskopie die erfolgreiche Aufnahme des Konjugats *in vitro* in humanen Krebszellen HeLa bestätigen. Die Regulationsfähigkeit der aufgenommenen siRNA wurde anhand eines Luciferase-Reportersystems quantifiziert, welches zuvor mittels Plasmid-Transfektion in die Zellen eingeführt wurde. Dabei bewirkte die Folsäure-siRNA eine konzentrationsabhängige Regulation der Luciferase-Expression bis zu einer maximalen Reduktion der Expression um 45 %.

1.3.4 Peptid-modifizierte siRNA

Bei der Aufnahme von siRNA durch deren Modifikation mit Peptiden muss generell zwischen Peptid-Liganden und zellpenetrierenden Peptiden unterschieden werden. Peptid-Liganden adressieren selektiv einen Oberflächenrezeptor und ermöglichen dadurch eine Zell-spezifische Aufnahme der siRNA. Zellpenetrierende Peptide sind hingegen in der Lage, Zellmembranen ohne Beteiligung eines Transportsystems zu überwinden. Diese Peptide sind meist reich an Arginin und Lysin und können daher gut mit der negativen Zellmembran wechselwirken.^[141] Der Aufnahme-Mechanismus ist dabei abhängig vom Peptid und in vielen Fällen noch unklar.^[142] So werden einige dieser Peptide nicht durch Endocytose aufgenommen, sondern können Zellmembranen direkt durchdringen.^[130, 136] Die erfolgreiche Aufnahme von siRNA durch zellpenetrierende Peptide wurde bisher von *Eccles*^[143] und *Rana*^[144] unter Verwendung der Peptide Transportan, Penetratin und HIV-1 TAT₄₇₋₅₇ beschrieben. Als Peptid-Ligand diente *Wickstrom*^[145] ein mimetisches Peptidanalogen zu IGF1 und *Juliano*^[146] das zyklische Peptid Arginin-Glycin-Asparagin (cRGD).

Eccles verwendete die *zellpenetrierenden Peptide* Penetratin und Transportan, um damit *in vitro* die Aufnahme von siRNA in Nierenzellen COS7 und in Ovarienzellen CHO zu ermöglichen.^[143] Die siRNA wurde mit den Peptiden am 5'-Ende des *sense*-Strangs über ein Disulfid verbunden, um eine Freisetzung innerhalb des reduktiven Milieus des Cytoplasmas zu ermöglichen (Abbildung 1.14a).^[122] Die Regulationsfähigkeit der aufgenommenen siRNA wurde anhand eines Luciferase-Reportersystems quantifiziert, welches zuvor mittels Plasmid-Transfektion in die Zellen eingeführt wurde. In Nierenzellen COS7 konnte *Eccles* mit Hilfe der Penetratin-siRNA die Expression der Luciferase um maximal 40 % reduzieren. Das Transportan-Konjugat bewirkte eine geringfügig gesteigerte Regulation und führte zu einer maximalen Reduktion der Luciferase-Expression um 52 %. Das kommerzielle Transfektionsreagenz Lipofektamin 2000 führte zu einer vergleichbaren Reduktion um 56 %. In Ovarienzellen CHO erwiesen sich beide Peptide effektiver als in COS7-Zellen und konnten eine höhere Regulation als Lipofektamin 2000 erzielen. So bewirkte Penetratin-siRNA eine maximale Reduktion der Luci-

ferase-Expression um 53 % und Transportan-siRNA eine maximale Reduktion der Luciferase-Expression um 63 %. Das kommerzielle Transfektionsreagenz Lipofektamin 2000 konnte die Expression lediglich um 36 % reduzieren. *Eccles* interpretierte diese hohe Effektivität der Penetratin- bzw. Transportan-siRNA anhand der direkten Aufnahme anstelle von Rezeptor-vermittelter Endocytose, da die siRNA nicht aus dem Endosom entweichen muss, sondern unvermittelt in das Cytoplasma transportiert wird.

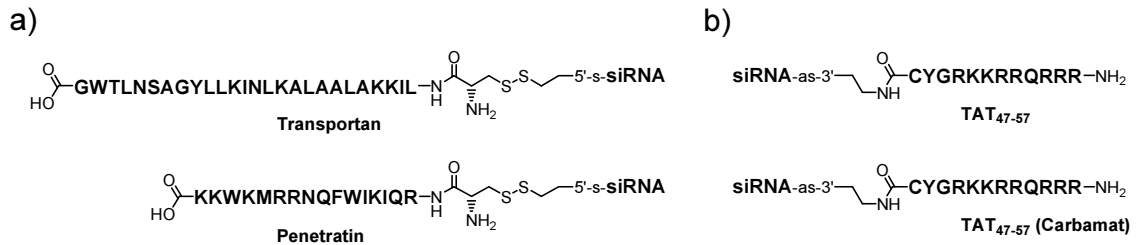


Abbildung 1.14: Modifikation von siRNA mit zellpenetrierenden Peptiden, **a)** Transportan- und Penetratin-modifizierte siRNA von *Eccles*,^[143] **b)** TAT₄₇₋₅₇- und TAT₄₇₋₅₇(Carbamate)-modifizierte siRNA von *Rana*.^[144]

Rana verwendete als *zellpenetrierendes Peptid* das HIV-1 TAT₄₇₋₅₇-Motif,^[147] um damit *in vitro* die Aufnahme von siRNA in humanen Krebszellen HeLa zu ermöglichen (Abbildung 1.14b).^[144] Die Modifikation der siRNA erfolgte am 3'-Ende des *antisense*-Strangs, wobei neben dem natürlichen TAT₄₇₋₅₇-Motif zusätzlich ein Protease-resistentes TAT₄₇₋₅₇-Motif mit einem Carbamat-Rückrad verwendet wurde. Die Regulationsfähigkeit der aufgenommenen siRNA wurde anhand eines *Green Fluorescent Protein* (GFP) Reportersystems quantifiziert, welches zuvor mittels Plasmid-Transfektion in die Zellen eingeführt wurde. Mit Hilfe des TAT₄₇₋₅₇-Konjugats konnte *Rana* die GFP-Expression um maximal 70 % reduzieren. Er erreichte damit eine vergleichbare Effektivität wie das kommerzielle Transfektionsreagenz Lipofektamin, welches eine maximale Reduktion der GFP-Expression um 87 % bewirkte. Das TAT₄₇₋₅₇(Carbamate)-Konjugat bewirkte trotz der erhöhten Protease-Resistenz eine geringere Regulation als das natürliche TAT₄₇₋₅₇-Konjugat und führte zu einer maximalen Reduktion der GFP-Expression um 33 %. In einem weiteren Experiment konnte *Rana* zeigen, dass das mehrfach positiv geladene TAT₄₇₋₅₇-Motif nicht als kationisches Polymer sondern als *zellpenetrierendes Peptid* fungiert. So bewirkte siRNA in Kombination mit nicht kovalent gebundenem TAT₄₇₋₅₇-Peptid keinerlei Regulation der GFP-Expression.

Wickstrom modifizierte eine siRNA mit einem mimetischen Peptidanalogen zu IGF1 (*Insulin-Like Growth Factor 1*), um dadurch *in vitro* die spezifische Aufnahme des Konjugats über den IGF1-Rezeptor in humanen Brustkrebszellen MCF7 zu ermöglichen (Abbildung 1.15a).^[145] Dabei wurde die siRNA am 5'-Ende des *sense*-Strangs mit dem Peptidanalogen zu IGF1 modifiziert und innerhalb des Duplexes mit 2'-Methoxy Nukleosiden stabilisiert. Mit Hilfe dieser IGF1-siRNA konnte *Wickstrom* die Expression des Insulin Rezeptor Substrat 1 Proteins (IRS-1) innerhalb humaner Brustkrebszellen MCF7 regulieren und bewirkte eine maximale Reduktion des IRS-1 mRNA-Levels um 64 %.

Juliano verwendete das zyklische Peptid Arginin-Glycin-Asparagin (cRGD) zur Modifikation von siRNA, um damit eine Zell-spezifische Aufnahme der siRNA zu ermöglichen (Abbildung 1.15b). Dieses zyklische Peptid bindet selektiv an den Oberflächenrezeptor $\alpha\beta 3$ Integrin und wird anschließend mittels Caveolae-vermittelter Endocytose in die Zellen aufgenommen.^[146] *Juliano* verwendete für seine Studien humane Melanomzellen M21+, da diese $\alpha\beta 3$ Integrin in großer Menge exprimieren.^[148] Die

siRNA wurde am 3'-Ende mit di-, tri und tetravalenten cRGD-Peptid modifiziert und zusätzlich mit dem Fluorophor Alexa 488 markiert. *Juliano* konnte mittels Durchflusszytometrie *in vitro* die erfolgreiche Aufnahme von di-, tri und tetravalenter cRGD-siRNA in humane Melanomzellen M21+ beobachten, wobei die Anzahl an cRGD-Peptid keinen Einfluss auf die Effektivität hatte. Die Regulationsfähigkeit der aufgenommenen siRNA wurde anhand eines Luciferase-Reportersystems quantifiziert, welches zuvor mittels Plasmid-Transfektion in die Zellen eingeführt wurde. Hier konnte eine gesteigerte Regulationsfähigkeit bei einer erhöhten Anzahl an cRGD-Peptiden detektiert werden. So bewirkte die divalente cRGD-siRNA eine maximale Reduktion der Luciferase-Expression um 20 % wohingegen tri- und tetravalente cRGD-siRNA eine maximale Reduktion der Luciferase-Expression um 40 % erzielten. Als mögliche Ursache wurde von *Juliano* u.a. die erhöhte positive Ladung durch die zusätzlichen Arginine postuliert. Dies könnte ähnlich dem Wirkprinzip bei Polyethylenimin das Endosom durch den „Protonenschwamm-Effekt“ destabilisieren.

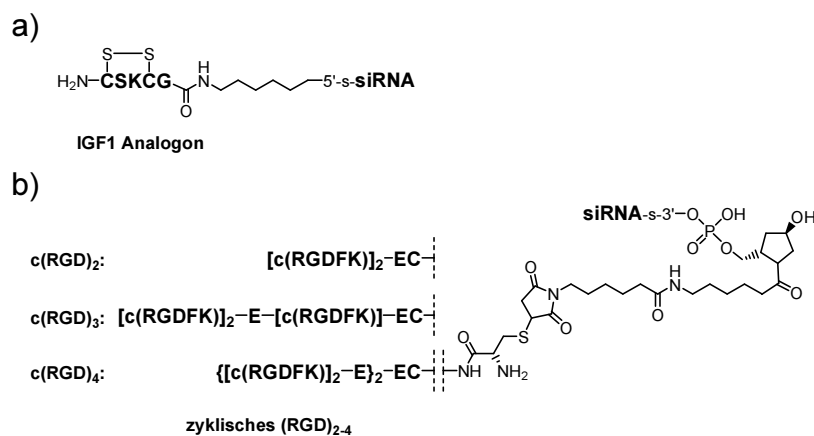
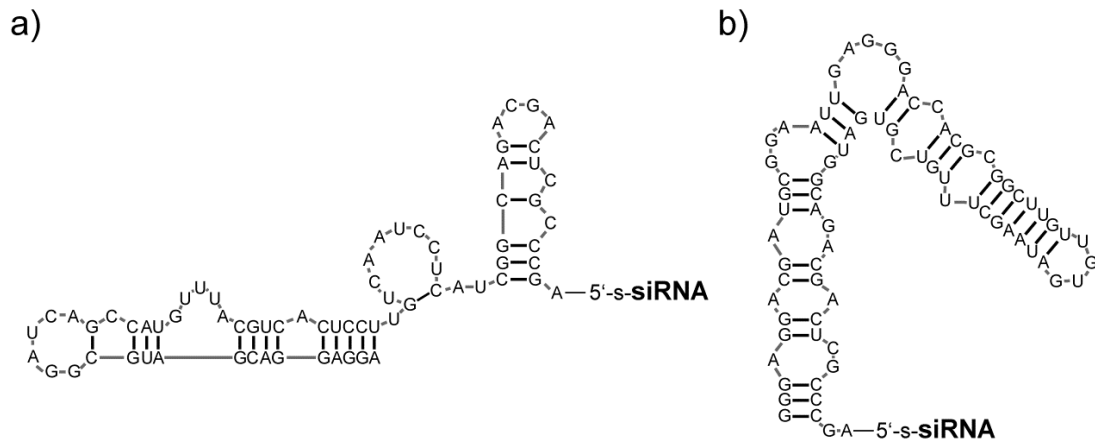


Abbildung 1.15: Modifikation von siRNA mit spezifischen Peptid-Liganden, **a)** IGF1-modifizierte siRNA von *Wickstrom*,^[145]
b) cRGD-modifizierte siRNA von *Juliano*.^[146]

1.3.5 Aptamer-modifizierte siRNA

Aptamere sind *in vitro* synthetisierte einzelsträngige DNA- oder RNA-Struktur motive, welche durch ihre definierte 3-dimensionale Struktur mit hoher Spezifität an Proteine binden können.^[149] Dabei zeichnen sich Aptamere durch ihre hohe Bindungsaffinitäten vergleichbar zu Antikörpern aus. Aptamere wurden bereits erfolgreich zur Adressierung von Membran-Rezeptoren eingesetzt, um dadurch die Zell-spezifische Aufnahme diverser Reagenzien zu ermöglichen.^[150] Die spezifische Aufnahme von siRNA durch deren Modifikation mit Aptameren wurde bisher von *Giangrande*^[151] und *Rossi* beschrieben.^[152]

Giangrande verwendete zur Modifikation der siRNA ein Aptamer, welches selektiv an den PSMA-Rezeptor (*Prostate-Specific Membrane Antigen*) bindet,^[153] um damit die Aufnahme in Prostata-Krebszellen zu ermöglichen.^[151] Die siRNA wurde am 5'-Ende des *sense*-Strangs mit dem Aptamer modifiziert und zur Stabilisierung alle Pyrimidin-Nukleoside durch die jeweiligen 2'-Fluoro-Nukleoside ersetzt (Abbildung 1.16a). *Giangrande* verwendete für seine Studien humane Prostata-Krebszellen LNCaP, da diese den PSMA-Rezeptor vermehrt exprimieren.^[151] Mit Hilfe der Aptamer-siRNA ließ sich *in vitro* die Expression zweier überlebenswichtiger Gene regulieren, welche in den meisten Krebszellen überexprimiert werden.^[154] So bewirkte das Konjugat in humanen Prostata-Krebszel-



Rossi verwendete zur Modifikation der siRNA ein Aptamer, welches spezifisch an das Glycoprotein GP120 bindet.^[152, 155] Bei diesem Glycoprotein handelt es sich um ein Hüllprotein von HI-Viren, welches eine entscheidende Rolle bei der Infektion von Wirtszellen spielt.^[156] Die siRNA wurde am 5'-Ende des *sense*-Strangs mit dem Aptamer modifiziert und zur Stabilisierung analog zu *Giangrande* alle Pyrimidin-Nukleoside durch die jeweiligen 2'-Fluoro-Nukleoside ersetzt (Abbildung 1.16b). *Rossi* verwendete in erster Instanz Ovarienzellen CHO, welche zuvor mit der Glykoprotein-Mutante GP160 stabil transfiziert wurden. Die Regulationsfähigkeit der aufgenommenen siRNA wurde anhand eines Luciferase-Reportersystems quantifiziert, welches zuvor mittels Plasmid-Transfektion in die Zellen eingeführt wurde. Mit Hilfe der Aptamer-siRNA ließ sich *in vitro* die Expression der Luciferase regulieren und bewirkte eine maximale Reduktion um 80 %. Darüber hinaus konnte das Aptamer in Abwesenheit der siRNA die HIV-Infektionsrate bei humanen T-Lymphozyten CEM durch Interaktion mit dem Glycoprotein GP120 der HI-Viren erfolgreich reduzieren. Durch zusätzliche Modifikation des Aptamers mit siRNA konnte ein dualer Wirkmechanismus gegenüber HI-Viren in humanen Lymphozyten PBMC etabliert werden. So ließ sich neben der reduzierten Infektionsrate zusätzlich die Expression des *Tat/rev* Gens der HI-Viren in humanen Lymphozyten PBMC regulieren und bewirkte eine maximale Reduktion des *Tat/rev* mRNA-Levels um 60 %. Um der hohen Mutationsrate des HI-Virus (*viral escape*) entgegenzuwirken, verwendete *Rossi* zusätzlich ein Aptamer mit einem Hybridisierungs-Anker bestehend aus 16 Nukleosiden. Durch Hybridisierung mit einer siRNA, welche um die komplementäre Ankersequenz verlängert wurde, ließe sich dieses Aptamer prinzipiell mit beliebig vielen siRNAs verbinden. *Rossi* konnte zeigen, dass das so konstruierte Aptamer-siRNA Konjugat eine vergleichbare Effektivität wie das direkte Aptamer-siRNA Konjugat besaß und damit die Einsatzmöglichkeit dieser Strategie bestätigen.

1.4 Das Endocannabinoidsystem

In dieser Arbeit wurde die siRNA mit dem Endocannabinoid Anandamid modifiziert, um damit deren spezifische Aufnahme in Nerven- und Immunzellen zu ermöglichen. Anandamid ist ein endogener Ligand der Cannabinoid-Rezeptoren, welche innerhalb des Nerven- und Immunsystems exprimiert werden. Der folgende Abschnitt gibt eine detaillierte Übersicht über dieses Liganden-Rezeptor-System, das sogenannte Endocannabinoidsystem. Das Endocannabinoidsystem (ECS)^[157] ist bei der Regulation einer Vielzahl zentraler und peripherer Prozesse wie Schmerztoleranz, Gehirnausprägung, neuronaler Kommunikation, Erinnerungsvermögen, Appetit, Psychomotorische Kontrolle, Kardiovaskulär- und Immunregulation, sowie Zellwachstum beteiligt.^[158] Durch dieses breite Spektrum stellt es ein wichtiges therapeutisches Ziel für die Behandlung diverser Symptomaten wie Asthma, Schmerz, Multiple Sklerose, bösartige Gliome und neurodegenerative Krankheiten dar und wird daher intensiv erforscht.^[159] Generell umfasst das ECS die beiden G-Protein gekoppelten Cannabinoidrezeptoren CB₁^[7d] und CB₂,^[7f] deren endogene Liganden sowie die intrazelluläre Signaltransduktion und deren Termination.

1.4.1 Die Cannabinoidrezeptoren

Der CB₁-Rezeptor ist im zentralen Nervensystem lokalisiert. Die höchsten Expressionslevel wurden in Basalganglien, dem Hippocampus, der Großhirnrinde und dem Zerebellum nachgewiesen.^[7a-d] Die Aktivierung durch Cannabinoide führt zur Inhibition von Adenylylcyclasen,^[160] Ca²⁺-Kanälen^[161] und K⁺-Kanälen^[162] und reduziert dadurch unter anderem die Freisetzung des exzitotoxischen Neurotransmitters Glutamat.^[163] Cannabinoide besitzen somit neuroprotektive Eigenschaften.^[163b, 164] Der CB₂-Rezeptor ist vorwiegend peripher in B-Lymphozyten, Makrophagen und Mastzellen lokalisiert und wird daher dem Immunsystem zugeordnet.^[7e-g] Adler konnte diese Zuordnung bestätigen indem er nachwies, dass die Aktivierung des CB₂-Rezeptors durch Cannabinoide eine direkte Unterdrückung der Immunreaktion in Mäusen bewirkte.^[165] Die Aktivierung des CB₂-Rezeptors führt ebenfalls zur Inhibition der Adenylylcyclase.^[160b] Darüber hinaus deuten zahlreiche Studien darauf hin, dass er im Zusammenhang mit Fruchtbarkeit und Fortpflanzung eine wichtige Rolle spielt.^[166] Die vollständige Rolle des CB₂-Rezeptors ist allerdings noch unbeantwortet. Generell stimuliert die Aktivierung beider Cannabinoidrezeptoren die so genannte Cannabinoid-Tetrade, welche zu Hypothermie, Schmerzunempfindlichkeit, Starrkrampf und Hypomotilität führt.^[160, 167]

Die ersten selektiven Liganden für die Cannabinoidrezeptoren wurden aus der Pflanze *Cannabis sativa* isoliert und waren dadurch bestimmend für die Namensgebung. Diese klassischen Cannabinoide wie Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) grenzen sich durch ihr trizyklisches Terpengerüst von nichtklassischen Cannabinoiden ab, welche das trizyklische Gerüst nicht aufweisen.^[168] Die körpereigenen Agonisten der Cannabinoidrezeptoren werden als Endocannabinoide bezeichnet und gehören alle zur Klasse der Eicosanoide.^[168] Neben dem Endocannabinoid Arachidonylethanolamid (Anandamid AEA)^[169] wurden bisher 2-Arachidonoylglycerol (2-AG),^[170] 2-Arachidonyl glyceryl ether (2-AGE)^[171] und O-Arachidonylethanolamine (Virodhamin)^[172] als Endocannabinoide identifiziert. In Abbildung 1.17 sind exemplarisch zwei klassische und nichtklassische Cannabinoide sowie die bisher identifizierten Endocannabinoide dargestellt.

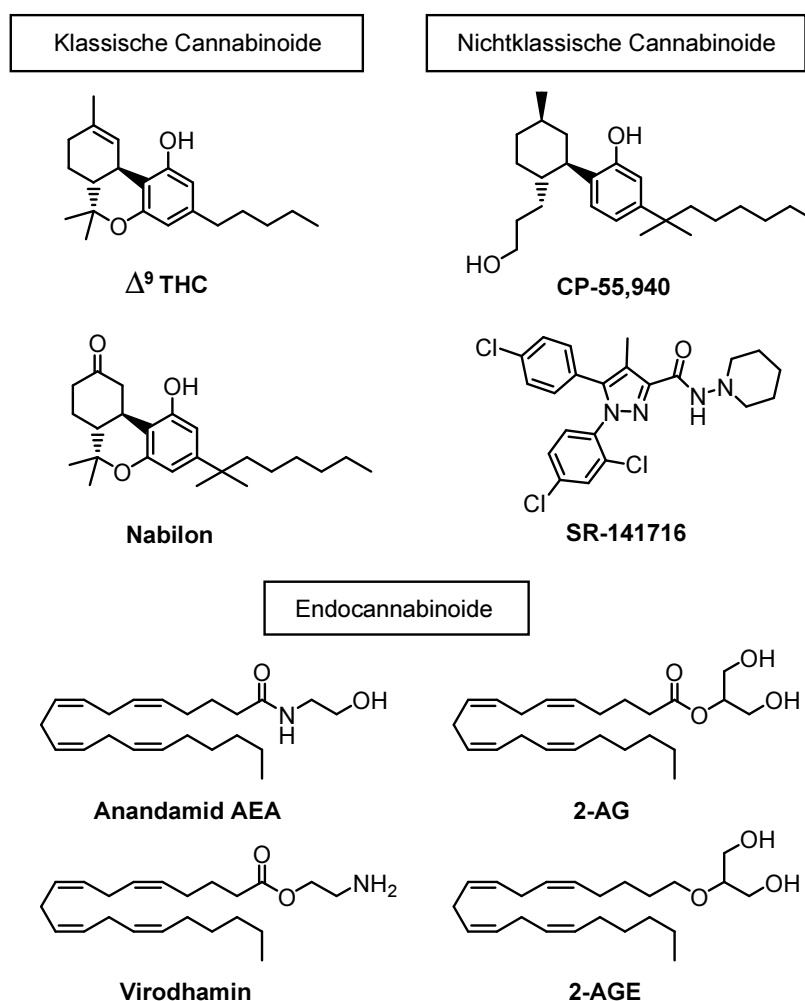


Abbildung 1.17: Liganden der Cannabinoidrezeptoren. Klassische Cannabinoide Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) und Nabilon, nichtklassische Cannabinoide CP-55,940 und SR-141716 und die bisher identifizierten Endocannabinoide Anandamid (AEA), Virodhamin, 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) und 2-Arachidonoyl glyceryl ether (2-AGE).

1.4.2 Das Endocannabinoid Anandamid

Arachidonylethanolamid (Anandamid AEA) wurde erstmals von *Mechoulam* aus Schweinehirnextrakt isoliert und aufgrund seiner euphorisierenden Wirkung als Anandamid (Ananda=Glückseligkeit) benannt.^[169] Diese cannabimimetische Wirkung von AEA wird hervorgerufen durch Aktivierung der Cannabinoidrezeptoren, wobei AEA sowohl an den CB₁-Rezeptor^[160a, 167b, 169, 173] wie auch an den CB₂-Rezeptor bindet.^[7g] Im Vergleich zu den anderen Eicosanoiden wurde es als effektivstes Endocannabinoid eingestuft.^[173c] Die exakte Rolle von AEA konnte allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt werden. So wurde für AEA neben der Affinität zu den Cannabinoidrezeptoren eine gewisse Affinität bezüglich des Peroxisomen-Proliferator-aktivierenden Rezeptors PAAR,^[7f, 173a, 174] des Vanilloid Rezeptorkanals TRPV1^[175] und des GPR55 Rezeptors^[176] nachgewiesen. Entgegen anderer Neurotransmitter wird AEA nicht durch die Freisetzung aus Lagerungsvesikeln mobilisiert, sondern bei Bedarf innerhalb der Zelle synthetisiert. Die Biosynthese erfolgt aus dem Phospholipid-Ausgangsstoff *N*-Arachidonoylphosphatidylethanolamin (NAPE) durch eine Phospholipase NAPE-PLD.^[177] AEA besitzt eine ähnliche physiologische und biochemische Wirkung wie klassische Cannabinoide^[160a, 167b, 173a, 178] und zeigt vergleichbare pharmakologische Wirkung wie Δ^9 -THC hinsichtlich der Cannabinoid-Tetrade,

jedoch mit deutlich kürzerer Wirkungsdauer.^[167b, 173a, 179] Die verkürzte Wirkung von AEA begründet sich durch die rasche Aufnahme in die Zelle gefolgt von intrazellulärem Abbau zur Deaktivierung der Signaltransduktion.^[177a, 178, 179d] Dieser effektive Transportmechanismus ist derzeit trotz intensiver Forschung nicht vollständig aufgeklärt und wird kontrovers diskutiert.

1.4.3 Aufnahme von Anandamid

Die Aufnahme von AEA wurde bisher in C6 Gliomen,^[180] U937 Lymphomen,^[181] CHP100 Neuroblastomen,^[181] N18TG2 Neuroblastomen,^[180] CCF-STTG1 Astrozytomen,^[182] primären Neuronalzellen des Kleinhirns,^[178] Neuronen des Striatums,^[177a] Astrozyten,^[177a, 182] Korkalneuronen^[183] und RBL-2H3 Mastzellen^[7g, 9] nachgewiesen.

Wie bereits aufgeführt, wird der Aufnahme-Mechanismus kontrovers diskutiert. Einigkeit herrscht darüber, dass AEA zur Deaktivierung des Cannabinoidrezeptors in die Zelle transportiert und anschließend intrazellulär abgebaut wird. Dieser Abbau hält den Konzentrationsgradienten von AEA zwischen extra- und intrazellulärem Bereich aufrecht und verstärkt dadurch die weitere Aufnahme in die Zelle. Der Abbau wird dominiert durch die enzymatische Hydrolyse von AEA zu Arachidonsäure und Ethanolamid durch die Fettsäureamid-Hydrolase FAAH, welche am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist.^[9f, 180, 184] Neben der dominanten Hydrolyse kann AEA ebenfalls durch enzymatische Oxidation abgebaut werden. Durch die Cyclooxygenase COX-2 wird AEA zum korrespondierenden Prostaglandin oxidiert.^[185] Die Lipoxygenasen 12-LOX und 15-LOX sind in der Lage, AEA zu den korrespondierenden Hydroxyperoxyeicosatetraenylethanolamiden 12-HETE-EA und 15-HETE-EA zu oxidieren.^[164g, 186] Der enzymatische Abbau von AEA durch Hydrolyse oder Oxidation ist in Abbildung 1.18 illustriert.

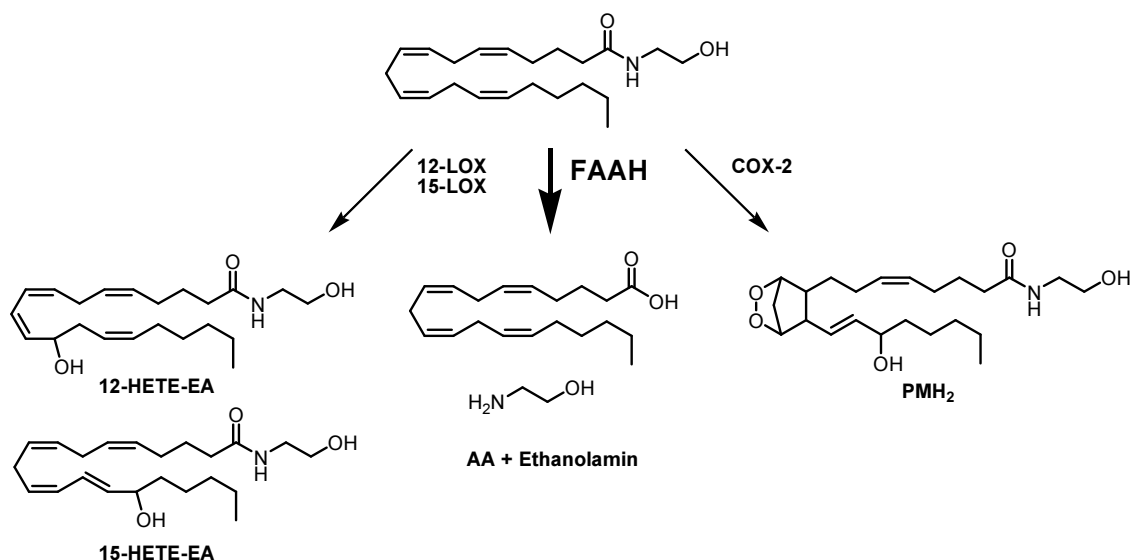


Abbildung 1.18: Enzymatischer Abbau von Anandamid innerhalb der Zelle durch die Hydrolase FAAH oder durch die Oxidasen 12-LOX, 15-LOX oder COX-2. Der Abbau wird dominiert durch die Hydrolyse von Anandamid zu Arachidonsäure und Ethanolamin.

Campbell konnte zeigen, dass sich Isotopen-markiertes [^3H]AEA gegen einen Konzentrationsgradienten von AEA in Kleinhirnzellen anreichte und dass sich die Aufnahme von AEA in die Kleinhirnzellen erst bei einem innerzellulären Überschuss sättigte.^[178] Diese Studie untermauerte den gerichteten Transport von AEA in die Zellen. Zahlreiche Studien haben darüber hinaus gezeigt, dass die Aufnahme von AEA selektiv inhibierbar, temperaturabhängig, sättigungsfähig und unabhängig von Energie in Form von Ionengradienten oder ATP-Hydrolyse verläuft und damit die Kriterien für eine Protein-unterstützte Aufnahme erfüllt.^[9a, 9h, 177a, 178, 181-182]

Diese Protein-unterstützte Aufnahme von AEA ließe sich prinzipiell durch erleichterte passive Diffusion,^[187] ein Membrantransport-Protein,^[182, 188] intrazelluläre Einlagerung,^[178, 189] oder durch Transporter-vermittelte Caveolae-ähnliche Endozytose^[9a, 9d, 190] interpretieren. Die möglichen Mechanismen und die potentiell beteiligten Prozesse sind in Abbildung 1.19 dargestellt und werden im folgenden Text vorgestellt und diskutiert.

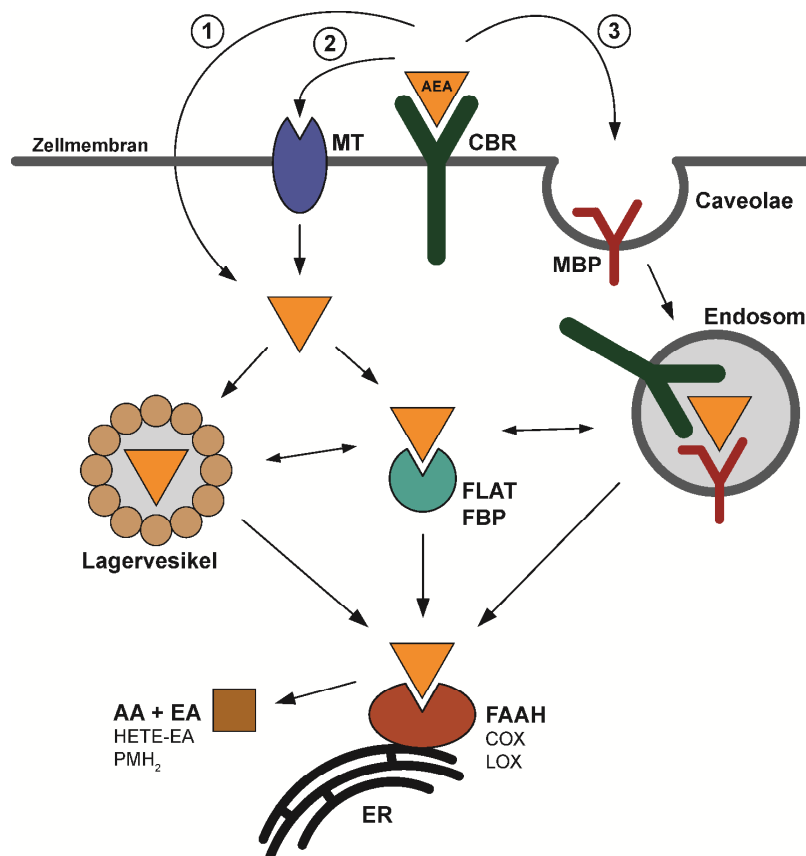


Abbildung 1.19: Mögliche Aufnahme-Mechanismen, intrazellulärer Transport und enzymatischer Abbau von AEA nach der Aktivierung des Cannabinoidrezeptors (CBR). Die Aufnahme in die Zelle erfolgt durch (1) passive Diffusion, (2) einen Membrantransporter (MT) oder durch (3) Caveolae-ähnliche Endozytose unter möglicher Beteiligung eines zusätzlichen Membranbindeproteins (MBP). Intrazellulär wird AEA durch das selektive AEA-Transportprotein (FLAT) oder unspezifische Fettsäurebindeproteine (FBP) zu FAAH am endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert. Dort erfolgt die Hydrolyse durch FAAH zu Arachidonsäure (AA) und Ethanolamin (EA) oder die Oxidation durch LOX und COX zu Hydroxyperoxyeicosatetraenylethanolamid (HETE-EA) und Prostaglandin (PMH₂). Neben Transportproteinen könnten Lagervesikel oder Endosome während des intrazellulären Transports beteiligt sein.

Die Aufnahme des hydrophoben AEA könnte prinzipiell allein durch passive Diffusion erfolgen, welche durch die Hydrolyse von AEA durch FAAH erleichtert wird.^[187] So waren HeLa Zellen nach Transfektion mit FAAH ebenfalls in der Lage, AEA zu einem gewissen Grad aufzunehmen und diese Auf-

nahme ließ sich ebenfalls durch MAFP inhibieren.^[9f] Es existieren jedoch auch Studien, in denen selektive FAAH-Inhibitoren die Aufnahme von AEA nicht beeinflussten.^[182, 191] Allerdings lässt sich nur schwer nachweisen, ob die gewählten Aufnahme-Inhibitoren dabei tatsächlich primär auf FAAH wirken.^[184b, 192] Ramos konnte in einer Studie mit unterschiedlichen Aufnahme-Inhibitoren keine eindeutige Korrelation zwischen der Inhibition von FAAH und der Aufnahme von AEA feststellen und folgte daraus, dass die Aufnahme von AEA und die Hydrolyse durch FAAH pharmakologisch separiert werden können.^[193] Entgegen dieser Annahme führten einige selektive FAAH-Inhibitoren zu einer Erhöhung der pharmakologischen Auswirkungen von AEA *in vitro* und *in vivo*.^[173b, 194] Diese Studien weisen darauf hin, dass AEA nicht allein durch erleichterte Diffusion in die Zellen transportiert wird. Darüber hinaus hätte AEA aufgrund seines hydrophoben Charakters kein Bestreben durch das Zytoplasma zu FAAH am endoplasmatischen Retikulum zu diffundieren.

Zahlreiche Studien haben Substanzen identifiziert, welche die Aufnahme von AEA inhibierten, aber keinerlei Auswirkung auf FAAH-Aktivität besaßen.^[183, 193, 195] Des Weiteren ließ sich die Aufnahme von AEA auch in Zellen inhibieren, die das Enzym FAAH nicht exprimieren.^[9f, 195d] Diese Beobachtungen lassen neben FAAH ein Transportprotein vermuten.^[183, 195c, d] Gestützt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass der derzeit potenteste Aufnahme-Inhibitor UCM707 nur geringe Affinität bezüglich der Cannabinoidrezeptoren und gegenüber FAAH aufweist.^[193, 195b] AM404 ist ebenfalls ein selektiver Aufnahme-Inhibitor mit geringer Affinität zu FAAH.^[179d, 182] Der äußerst effektive Aufnahme-Inhibitor CP-55,940 verhält sich diesem Trend allerdings gegenläufig, da er eine hohe Affinität zu den Cannabinoidrezeptoren aufweist.^[196] Die Struktur des Antagonisten CP-55,940 ist in Abbildung 1.17 unter den nichtklassischen Cannabinoiden aufgeführt. Die Strukturen der beiden AEA Transport-Inhibitoren AM404 und UCM707 sind in Abbildung 1.20 dargestellt.

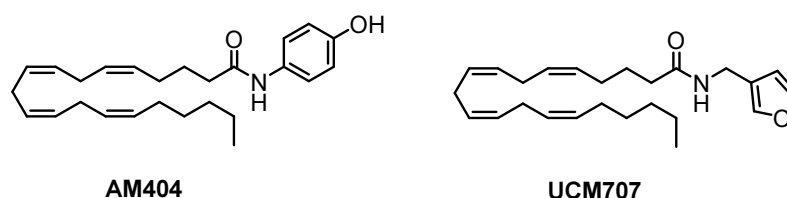


Abbildung 1.20: Anandamid Transport-Inhibitoren AM404 und UCM707.

Alternativ oder zusätzlich zu einem Membrantransporter konnte *Deutsch* die Beteiligung intrazellulärer Fettsäurebindepoteine bei der Aufnahme von AEA nachweisen. Diese Fettsäurebindepoteine (FABP)^[197] sind generell bei dem intrazellulären Transport hydrophober Fettsäuren beteiligt und könnten nach *Deutsch* den Transport von AEA von der Zellmembran durch das Cytosol zu FAAH am endoplasmatischen Retikulum unterstützen.^[198] *Piomelli* gelang 2012 erstmals die Charakterisierung eines selektiven intrazellulären Transporters für AEA.^[199] Hierbei handelt es sich um die katalytisch inaktive FAAH-Variante FLAT, welche AEA zwar bindet aber nicht hydrolisiert. FLAT besitzt darüber hinaus eine bessere Löslichkeit in Wasser als FAAH und ermöglicht damit den Transport von AEA durch das Cytosol. *Piomelli* konnte zeigen, dass FLAT entgegen den unselektiven Fettsäurebindepoteinen (FBP) innerhalb der Eicosanoide spezifisch AEA bindet und daher als selektives Transportprotein angesehen werden kann.^[199]

Intrazelluläres AEA könnte dem Gleichgewicht neben enzymatischem Abbau auch durch Einlagerung in Zellkompartimenten entzogen werden.^[189] Dieser Mechanismus wurde von *Hillard* und *Jarrahian* vorgeschlagen, da ihrer Meinung nach der Konzentrationsgradient von AEA vom Äußeren ins Innere der Zellen für einen enzymatischen Abbau zu stark ausgeprägt ist.^[189] Das eingelagerte AEA würde dem Gleichgewicht entzogen, wodurch ebenfalls der Konzentrationsgradient aufrecht erhalten bliebe. AEA könnte innerhalb dieser Kompartimente durch spezielle Proteine gebunden vorliegen. Diese Bindeproteine könnten ebenfalls durch Aufnahme-Inhibitoren adressiert werden, welche sich als inaktiv gegenüber FAAH erwiesen haben. Dies würde somit ebenfalls eine FAAH-unabhängige Inhibition der Aufnahme erklären.^[189]

Die Einlagerung von AEA in intrazellulären Kompartimenten könnte auch einem caveolae-ähnlichem endozytotischen Prozess entsprechen. Caveolae sind Cholesterin-reiche sackförmige Einstülpungen der Plasmamembran. Caveolin-Proteine stellen dabei ein wichtiges Strukturelement dar.^[200] Die Aufnahme mittels Endozytose würde ebenfalls mit den beobachteten Charakteristiken der AEA-Aufnahme im Einklang stehen. Dieser Mechanismus wurde speziell in RBL-2H3 Zellen genauer untersucht: Der Entzug von Cholesterol aus der Zellmembran durch Nystatin/Progesteron und die damit verbundene Störung der Caveolae führte zu einer Senkung der Aufnahme von AEA um 50 %.^[9d] *N*-Ethylmaleimid und Genistein, welche Caveolae-bezogene Endozytose inhibieren,^[201] waren ebenfalls in der Lage die Aufnahme von AEA signifikant zu senken.^[9d] Die Hemmung der Aufnahme von AEA durch Inhibitoren, welche nur geringe Affinität zu den Cannabinoidrezeptoren aufweisen ließe sich wie schon im Modell der Einlagerung durch ein zusätzliches Bindungsprotein für AEA innerhalb der Caveolae erklären. Die Lokalisierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren vor und während der caveolae-ähnlichen Endozytose ist derzeit in nur wenigen Systemen vollständig verstanden^[197] und im Fall der Cannabinoidrezeptoren nahezu unbeantwortet.^[198]

1.4.4 Selektivität der Aufnahme von Anandamid

Die Selektivität der Aufnahme von AEA wurde in zahlreichen Studien durch diverse Strukturanaloga untersucht. Wie bereits oben aufgeführt, gehört AEA wie auch die anderen Endocannabinoide der Klasse der Eicosanoide an. Weitere biologisch aktive Eicosanoide wie Prostaglandin E₂, Leukotrien B₄, Leukotrien C₄, Thromboxan B₂ oder 5-Hydroxyeicosatetraensäure konnten die Aufnahme von AEA allerdings nicht hemmen und weisen damit auf einen hoch selektiven Prozess hin.^[179d, 181-182] Das vollständig gesättigte AEA-Derivat Arachidoylethanolamid und Ethanolamide anderer Fettsäuren hemmten die Aufnahme von AEA ebenfalls nicht.^[9h, 177a, 178, 179d, 182] Ein AEA-Derivat mit einer trans-Doppelbindung innerhalb des Arachidonoylrestes wies innerhalb eines kompetitiven Aufnahme-Assays gegenüber [³H]AEA einen um zwei Größenordnungen höheren IC₅₀-Wert als AEA auf.^[179d] Ähnlich geringe Aufnahmefähigkeit konnte den AEA-Derivaten mit Hydroxygruppen oder Epoxiden entlang der Arachidonoylkette zugeordnet werden.^[178, 181] Unterschiedlichste Modifikationen der polaren Ethanolamid-Einheit von AEA zeigten eine strukturelle Toleranz an dieser Position hinsichtlich der Aufnahme. Jedoch konnten weder eindeutige Strukturtrends klassifiziert, noch deren Effekt eindeutig zugeordnet werden. Oft führte eine Modifikation an dieser Position zu einer drastischen Herabsetzung der Hydrolaseaktivität von FAAH.^[168, 178, 179d, 182, 193, 202]

Zusammenfassend handelt es sich bei der Aufnahme von AEA um einen hoch selektiven Prozess, wobei der Arachidonylrest von entscheidender Bedeutung ist. Modifikationen der polaren Einheit werden bei der Aufnahme zu einem gewissen Grad toleriert.

1.4.5 Anandamid Aufnahmesonden

Die meisten Aufnahmestudien von AEA wurden unter Verwendung von Isotopen-markiertem [^3H]AEA durchgeführt. Dabei hat [^3H]AEA den Vorteil, dass die strukturelle Integrität von AEA nahezu vollständig erhalten bleibt und die Aufnahme somit weitestgehend als unverfälscht bewertet werden kann. Allerdings lässt sich mit dieser Methode die Aufnahme in die Zellen nicht direkt verfolgen. Um die Aufnahme und die intrazelluläre Verteilung von AEA direkt verfolgen zu können, wurden deshalb die beiden AEA Aufnahmesonden SKM4-45-1^[202b] und Biotin-AEA^[203] synthetisiert (Abbildung 1.21).

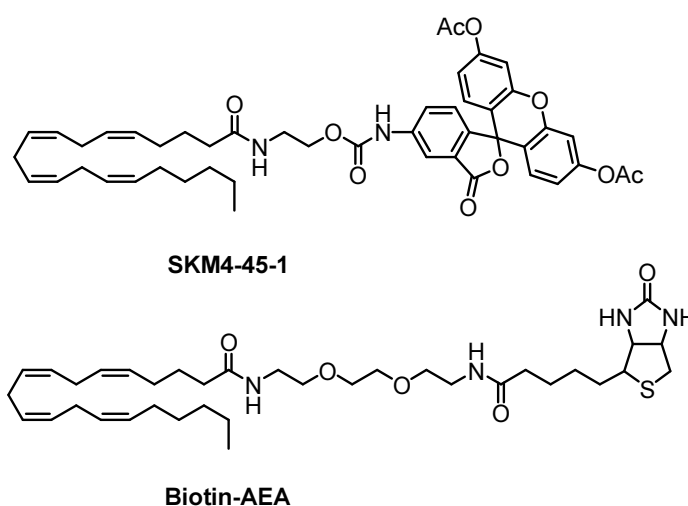


Abbildung 1.21: Anandamid Aufnahmesonden SKM4-34-1 von *Hillard* und Biotin-AEA von *Maccarrone*.

Das von *Hillard* etablierte AEA-Derivat SKM4-45-1 wurde an der polaren Einheit durch ein Fluoresceindiacetat modifiziert, um dadurch eine mikroskopische Detektion zu ermöglichen.^[202b] Der acetylierte Fluorescein-Rest dient dabei als Reporter für die Internalisierung in die Zellen, da dieser erst nach Deacetylierung durch intrazelluläre Esterasen fluoresziert. Die Aufnahme von SKM4-45-1 wurde durch *Hillard* in C6 Gliomen und in Neuronalzellen des Kleinhirns untersucht. Dabei konnte eine erfolgreiche Aufnahme in die Zellen mikroskopisch detektiert werden. Die Aufnahme von SKM4-45-1 ließ sich durch AEA inhibieren und SKM4-45-1 war umgekehrt ebenfalls in der Lage die Aufnahme von AEA zu inhibieren, wodurch auf einen gemeinsamen Aufnahme-Mechanismus geschlossen werden kann. Die Aufnahme von AEA und von SKM4-45-1 konnten durch den Transport-Inhibitor AM404 effektiv unterdrückt werden. Darüber hinaus konnte *Hillard* zeigen, dass SKM4-45-1 durch FAAH nicht hydrolysiert wurde. Diese Studie weist somit ebenfalls die dominante Rolle von FAAH zurück und gibt Hinweise darauf, dass auch sperrige Reste an der polaren Einheit von AEA während der Aufnahme toleriert werden.

Die Gruppe von *Maccarrone* modifizierte AEA mit einem Biotinrest, um dadurch eine Antikörperfärbung nach der Aufnahme in HaCaT-Zellen zu ermöglichen (Abbildung 1.21).^[203] Mit Hilfe dieser Aufnahme-Sonde konnte die erfolgreiche Aufnahme in HaCaT-Zellen mikroskopisch detektiert. Die

Hemmung der Aufnahme von Biotin-AEA und AEA durch den Inhibitor OMDM-1 konnte zeigen, dass die Aufnahme von Biotin-AEA ebenso effektiv wie die Aufnahme von AEA erfolgte. Mit Hilfe des selektiven CB1-Antagonisten SR141716 (siehe Abbildung 1.17) konnte die Aufnahme von Biotin-AEA um 35 % reduziert werden und untermauert damit eine Beteiligung der Cannabinoidrezeptoren während der Aufnahme. Biotin-AEA war außerdem in der Lage, die Aufnahme von AEA zu inhibieren, wodurch auch hier auf einen gemeinsamen Aufnahme-Mechanismus geschlossen werden kann. Darüber hinaus konnte Biotin-AEA, wie schon SKM4-45-1, nicht durch FAAH hydrolysiert werden. Dies bestätigt die geringe Toleranz von FAAH hinsichtlich der Modifikation von AEA an der polaren Einheit. Da die Aufnahme von Biotin-AEA trotz unterdrückter Hydrolyse ebenso effektiv wie von AEA erfolgte, konnte *Maccarrone* erneut die dominante Rolle von FAAH zurückweisen.

In einer zweiten Studie konnte *Maccarrone* diese dominante Rolle von FAAH erneut widerlegen und anstelle der Hydrolyse die Einlagerung in Vesikel als zusätzliche Triebkraft für die gerichtete Aufnahme von AEA identifizieren.^[204] So konnte *Maccarrone* in HaCaT-Zellen eindeutig die intrazelluläre Anreicherung von Biotin-AEA in Adiposomen nachweisen. Die Zuordnung erfolgte durch Anfärbung der mit Biotin-AEA angereicherten Vesikel durch den für Adiposomen selektiven Phenoxazinfarbstoff Nile Red.^[205] Bei Adiposomen handelt es sich um kleine Vesikel welche ubiquitär in Eukaryoten zur Speicherung von neutralen Fetten dienen. Adiposomen grenzen sich zum Cytosol durch eine Phospholipid-Monoschicht ab.^[206] Neben der erhöhten Anreicherung in den Adiposomen konnte Biotin-AEA homogen innerhalb des Cytosols und auch innerhalb des Zellkerns detektiert werden. Diese Beobachtungen wurden durch *Maccarrone* in neuronalen SH-SY5Y-Zellen und U-937 Lymphomen bestätigt.^[204]

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der tatsächliche Aufnahme-Mechanismus und die biologische Rolle von AEA derzeit nur teilweise aufgeklärt wurden. Die Aufnahme erfolgt selektiv und effektiv innerhalb des zentralen Nervensystems und des Immunsystems und stellt damit ein vielversprechendes Ziel für therapeutische Ansätze dar. Neben der direkten neuroprotektiven und immunregulatorischen Wirkung von AEA könnte dessen Aufnahme als Transport-Vehikel für selektive Wirkstoffe genutzt werden. Die Aufnahmesonden von *Hillard*^[202b] und *Maccarrone*^[203-204] konnten zeigen, dass die Aufnahme sperriger Reste mit Hilfe von AEA prinzipiell möglich wäre. Allerdings waren bezüglich dieser Strategie vor dieser Arbeit keine Ansätze in diese Richtung bekannt.

2 Aufgabenstellung

siRNA verspricht großen therapeutischen Nutzen, da mit ihrer Hilfe die Expression eines Gens gezielt unterdrückt werden kann. Eine entscheidende Hürde stellt allerdings der Transport der siRNA in die Zelle dar,^[4] da siRNA aufgrund ihrer negativen Ladung und ihrer Größe die Zellmembran nicht durchdringen kann.^[5] Neben ihrer Cytotoxizität haben sich diverse Transfektionsansätze vor Allem aufgrund ihrer Unspezifität als ungeeignet erwiesen, da die gezielte Regulation eines Gens nur durch eine Zell-spezifische Aufnahme der siRNA gewährleistet werden kann.^[5b, 6] Ein vielversprechender Lösungsansatz des zellspezifischen und nichttoxischen Transports von siRNA stellt deren Modifikation mit einem Rezeptor-Liganden dar.

Ziel dieser Arbeit war die Konstruktion eines siRNA Liganden-Konjugats, welches den gezielten Einsatz der siRNA in Immunzellen ermöglichen sollte. Als Transportsystem sollte dabei das sogenannte Endocannabinoidsystem (ECS)^[157] mit dem G-Protein gekoppelten Cannabinoidrezeptor CB₂^[7f] genutzt werden, da dieser Rezeptor innerhalb des Immunsystems exprimiert wird.^[7e-g] Zu diesem Zweck sollte die siRNA mit dem endogenen Cannabinoidrezeptor-Liganden Anandamid (AEA)^[7g, 169] modifiziert werden (Abbildung 2.1). Hierfür sollte eine geeignete Synthese zur Modifikation von siRNA mit AEA etabliert werden.

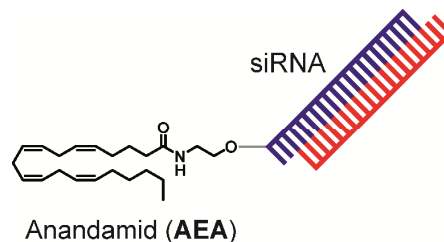


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der zu konstruierenden Anandamid-modifizierten siRNA. Dieses siRNA Liganden-Konjugat sollte die gezielte Adressierung von Immunzellen über den Cannabinoid-Rezeptor ermöglichen.

Wie in Kap. 1.4 aufgeführt, wird AEA nach der Rezeptor-Adressierung ins Innere der Zellen transportiert und anschließend intrazellulär abgebaut. Der Transportmechanismus von AEA konnte bisher trotz intensiver Forschung nicht vollständig aufgeklärt werden. Darüber hinaus war die Verwendung von AEA als Transportvehikel für Wirkstoffe und Oligonukleotide zu diesem Zeitpunkt gänzlich unerforscht. Daher sollten mikroskopische Studien in erster Instanz zeigen, ob die zelluläre Aufnahme von AEA-modifizierter siRNA prinzipiell möglich wäre. In diesem Zusammenhang galt es eine geeignete Zelllinie für die Studien zu wählen, welche repräsentativ für die Aufnahme von AEA in Immun- oder Nervenzellen stehen konnte.

Nach der erfolgreich AEA-vermittelten Aufnahme der siRNA sollte im nächsten Schritt deren regulatorische Fähigkeit untersucht werden. Hierfür sollte ein geeignetes Reportersystem zur akkuraten Quantifizierung der Genregulation etabliert werden. Abschließend sollte die generelle Anwendbarkeit des Liganden-Konjugats anhand eines therapeutisch relevanten Gens bestätigt werden.

3 Anandamid-vermittelte Aufnahme von Oligonukleotiden in Immunzellen

Zu Beginn dieser Dissertation gaben lediglich die in Kap. 1.4.5 vorgestellten Studien von *Hillard* mit SKM4-45-1^[202b] und von *Maccarrone* mit Biotin-AEA^[203-204] Hinweise darauf, dass sich AEA als Transportvehikel für Wirkstoffe eignen könnte. Allerdings handelte es sich bei den Modifikationen von AEA mit Biotin und Fluorescein um relativ unpolare Einheiten. Ob AEA in der Lage wäre, große polare Einheiten wie ein Oligonukleotid in Zellen einzuschleusen, war zu diesem Zeitpunkt gänzlich unerforscht. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurde AEA durch Oligonukleotide mit zunehmender Länge modifiziert. Beginnend mit einem Dinukleotid wurde das System schrittweise bis hin zu einem siRNA-Duplex erweitert. Da DNA gegenüber RNA eine weitaus höhere thermodynamische und enzymatische Stabilität aufweist,^[64] wurde zu Beginn der Studien auf DNA-Basis gearbeitet und das System anschließend auf RNA expandiert. Um die Aufnahme der Oligonukleotide ins Innere der Zellen mikroskopisch analysieren zu können, wurden diese zusätzlich mit Fluorescein markiert.

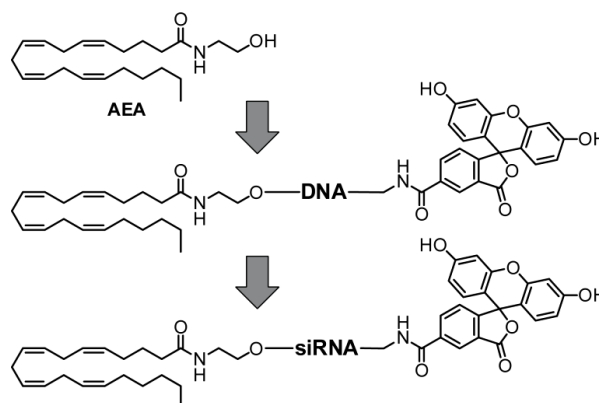
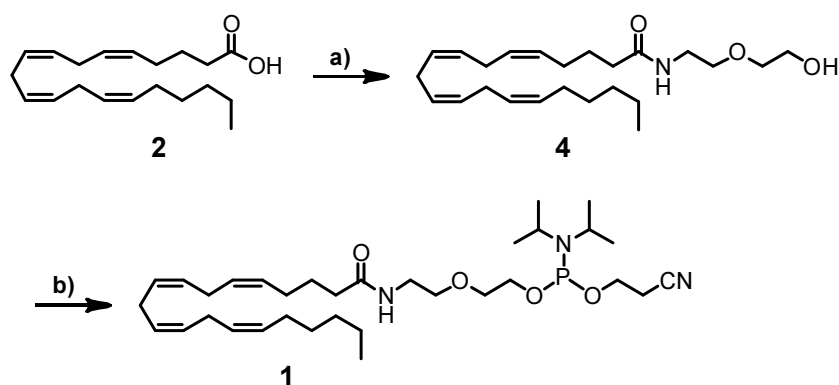


Abbildung 3.1: Konzeptioneller Aufbau der schrittweisen Untersuchung des AEA-vermittelten Transports von Oligonukleotiden. AEA wurde mit Oligonukleotiden zunehmender Länge bis hin zum siRNA-Duplex modifiziert. Die zusätzliche Markierung mit Fluorescein ermöglicht die mikroskopische Detektion der Aufnahme in die Zellen.

In Abbildung 3.1 ist das Konzept der schrittweisen Untersuchung der Aufnahmefähigkeit von AEA-modifizierten Oligonukleotiden bis hin zur siRNA dargestellt. Die Modifikation von AEA erfolgte an der Hydroxygruppe von AEA, da Modifikationen an dieser Position den geringsten Einfluss während der Aufnahme ausüben sollten.^[168, 178, 179d, 182, 193, 202] Zusätzlich bleibt dadurch die strukturelle Information des Cannabinoid-Liganden weitgehend erhalten und gewährleistet so eine optimale Selektivität während der Aufnahme. Für die Modifikation der Oligonukleotide mit AEA wurden zwei Strategien verfolgt: In einem ersten Ansatz wurden die Oligonukleotide während der Festphasensynthese mit AEA modifiziert. Zu diesem Zweck wurde ein entsprechendes AEA-Phosphoramidit synthetisiert. Im zweiten Ansatz wurden die Oligonukleotide postsynthetisch mittels Click-Chemie modifiziert. Hierfür wurde ein entsprechendes AEA-Azid synthetisiert. Nach abgeschlossener Synthese der modifizierten Oligonukleotide wurden Aufnahmestudien mittels Konfokal-Mikroskopie durchgeführt.

3.1 Festphasensynthese von Anandamid-modifizierten Oligonukleotiden

Zur Modifikation von Oligonukleotiden mit AEA während der Festphasensynthese wurde ein entsprechendes AEA-Phosphoramidit **1** synthetisiert (Schema 3.1). Dabei wurde AEA analog zu den Arbeiten von Hillard^[202b] und Maccarrone^[203-204] an der terminalen Hydroxygruppe substituiert. Die Synthese erfolgte in zwei Stufen ausgehend von Arachidonsäure **2** durch Amidkupplung mit 2(2-Aminoethoxy)ethanol **3** zu Anandamiderivat **4** und anschließender Funktionalisierung zum Phosphoramidit **1**. Dabei wurde durch die Kupplung der Arachidonsäure **2** mit dem kommerziell erhältlichen 2(2-Aminoethoxy)ethanol **3** die strukturelle Integrität des Cannabinoid-Liganden weitestgehend intakt gehalten. Die Amidkupplung in Abwesenheit einer Hydroxy-Schutzgruppe belegte die weitaus höhere Nukleophilie des primären Amins, da ausschließlich das Amid **4** anstelle des korrespondierenden Virodhaminesters gebildet wurde. Die Funktionalisierung des AEA-Derivats **4** mit 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphordiamidit (CEDCI) zum entsprechenden Phosphoramidit **1** verlief analog der Amidkupplung in exzellenter Ausbeute. Das Phosphoramidit **1** wurde mit entgastem Laufmittel chromatographisch aufgereinigt, um eine Oxidation der Phosphoramiditfunktionalität zu verhindern.



Schema 3.1: Synthese des AEA-Phosphoramidits **1** ausgehend von Arachidonsäure **2**. a) 2(2-Aminoethoxy)ethanol **3**, PyBOP, DIPEA, DCM, 3 h, RT, 94 %. b) CEDCI, DIPEA, DCM, 3 h, RT, 91 %.

Die Modifikation von Oligonukleotiden mit AEA unter Verwendung dieses Phosphoramidits **1** stellt aufgrund der kurzen und soliden Synthese eine durchaus effiziente Strategie dar. Zwei Nachteile sind hierbei jedoch zu bedenken: Zum Einen lassen sich damit Oligonukleotide nur endständig mit AEA modifizieren. Unter Verwendung von Standard-Phosphoramiditen für die Festphasensynthese resultiert dies in 5'-modifizierten Oligonukleotiden. Zum Anderen weist das Phosphoramidit **1** keine Tri-tylgruppe auf, welche standardmäßig zur Quantifizierung der Kupplungs-Effizienz verwendet wird. Dadurch lässt sich die Kupplungs-Effizienz des Phosphoramidits **1** während der Festphasensynthese nicht verfolgen.

Mit Hilfe des Phosphoramidits **1** wurden im nächsten Schritt AEA-modifizierte Oligonukleotide beginnend mit einer Kettenlänge von zwei Nukleotiden und sukzessiver Verlängerung auf zehn Nukleotide synthetisiert. Dabei wurde zur zusätzlichen Modifikation der Oligonukleotide mit einem Farbstoff am 3'-Ende ein Fluorescein-CPG Trägermaterial verwendet. Um das System möglichst einfach zu halten, wurde zunächst ausschließlich Thymidin (dT) als Nukleotid verwendet. Da Thymidin keine Schutz-

gruppen benötigt, mussten die synthetisierten Stränge lediglich vom Träger abgespalten werden. Neben diesem Vorteil zeichnet sich das Thymidin-Phosphoramidit durch exzellente Kupplungsausbeuten aus. Wie bereits aufgeführt, ließ sich die Effizienz der Kupplung des AEA-Phosphoramidits **1** während der Festphasensynthese nicht verfolgen. Die Analytik der synthetisierten Oligonukleotide mittels *reversed phase* HPLC ergab bei allen Strängen eine unvollständige AEA-Funktionalisierung mit einer gemittelten Ausbeute von nur ca. 20 % und untermauerte dadurch den postulierten Nachteil dieser Synthese-Strategie. Die geringen Ausbeuten könnten neben der unvollständigen Kupplung des AEA-Phosphoramidits **1** ebenfalls durch die Abspaltung der AEA-Modifikation während der abschließenden basischen Entschützung der Stränge verursacht worden sein. In diesem Fall allerdings war die unvollständige Kupplung durchaus von Vorteil, da für jeden AEA-modifizierten Strang zugleich der korrespondierende unmodifizierte Strang isoliert werden konnte. Somit erhielt man für jeden Strang die zugehörige Negativkontrolle innerhalb einer Festphasensynthese. Die synthetisierten Stränge ODN01 bis ODN10 sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Bezeichnung	Strang	Sequenz 5' → 3'
2n-mer +AEA	ODN01-05	AEA -(T-T) _n -FI
2n-mer	ODN06-10	(T-T) _n -FI

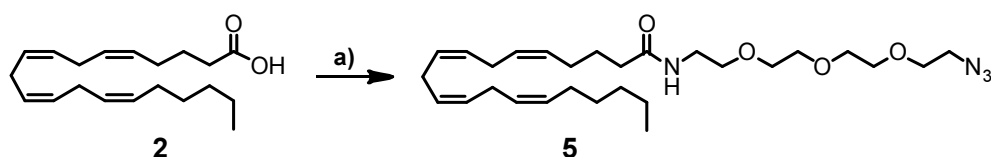
Tabelle 3.1: Synthetisierte dT-Oligonukleotide mit $n = 1 - 5$. Die AEA-Modifikation erfolgte durch das AEA-Phosphoramidit **1**. FI = Fluorescein.

3.2 Anandamid-Modifikation von Oligonukleotiden durch Click-Chemie

Aufgrund der im vorigen Abschnitt diskutierten Nachteile des AEA-Phosphoramidits **1** wurde die Modifikation der Oligonukleotide mit AEA unter Verwendung der als Click-Reaktion bekannten Kupfer(I) katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition durchgeführt. Diese von *Carell*^[207] und *Seela*^[208] etablierte Form der postsynthetischen Modifikation von Oligonukleotiden ist eine äußerst attraktive Alternative zur Modifikation während der Festphasensynthese dar. Für gewöhnlich wird hierzu eine Alkin-modifizierte Nukleobase während der Festphasensynthese an der gewünschten Position in das Oligonukleotid eingebaut und anschließend eine azidofunktionalisierte Modifikation unter Cu(I) Katalyse zur Reaktion gebracht. Diese ursprünglich von *Meldal*^[209] und *Sharpless*^[210] entwickelte Click-Reaktion zwischen einem Azid und einem terminalen Alkin zeichnet sich durch ihre hohe Ausbeute, die breite Toleranz funktioneller Gruppen und die milden Reaktionsbedingungen aus. Da Azide und terminale Alkine bisher in der Natur nicht nachgewiesen wurden, kann diese Cycloaddition als bioorthogonal eingestuft werden. Diese Eigenschaft ist speziell für die Modifikation von Oligonukleotiden in biologischen Systemen von großem Vorteil. Für die azidofunktionalisierte Modifikation liegt der Vorteil darin, dass diese nicht den harschen Bedingungen während der Festphasensynthese standhalten muss.

Um die postsynthetische Funktionalisierung eines Oligonukleotids mit AEA durch Click-Chemie zu ermöglichen, wurde das AEA-Azid **5** synthetisiert. Die Synthese erfolgte in einer einstufigen Synthese ausgehend von Arachidonsäure **2** durch Bildung eines Amids mit dem kommerziell erhältlichen Azido-3,6,9-trioxaundekan-1-amin (**6**) und ist in Schema 3.2 aufgeführt. Durch das gewählte Azidoamin **6** wurde wie schon im Fall des AEA-Phosphoramidits **1** die strukturelle Integrität des Cannabinoid-Liganden weitestgehend aufrechterhalten. Der verlängerte Ethylenglykol-Linker vergrößert zudem

die räumliche Trennung zwischen Ligand und Oligonukleotid und reduziert dadurch sterische Wechselwirkungen während der Aufnahme.



Schema 3.2: Synthese des AEA-Azids **5** ausgehend von Arachidonsäure **2**. a) Azido-3,6,9-trioxaundekan-1-amin (**6**), PyBOP, DIPEA, DMF, 3 h, RT, 96 %.

Mit Hilfe des AEA-Azids **5** war es nun möglich, das Spektrum AEA-modifizierter Oligonukleotide bis hin zur modifizierten siRNA auszuweiten (Tabelle 3.2). In erster Instanz wurde das AEA-Oligonukleotid Konjugat auf Basis von einzelsträngiger DNA hinsichtlich der Nukleotid-Länge erweitert. Dazu wurde das kommerziell erhältliche 19mer-Desoxynukleotid ODN11 mit AEA-Azid **5** durch Cu(I) Katalyse modifiziert. Dieses Oligonukleotid war mit Oktadiinyl-Desoxyuridin an der zweiten Position und Fluorescein am 5'-Ende modifiziert. Die Expansion zu doppelsträngiger DNA erfolgte unter Verwendung des von *Johannes Harder* synthetisierten 19mer-Desoxynukleotids ODN12, welches ebenfalls mit Oktadiinyl-Desoxyuridin an der zweiten Position modifiziert war. ODN12 wurde zuerst mit AEA-Azid **5** modifiziert und anschließend mit dem Fluorescein-markierten Gegenstrang ODN13 hybridisiert.

	Bezeichnung	Strang	Sequenz
ssDNA	ssDNA +AEA	ODN11+5	5' -F1CGT-CGT-CGT-CGT-CGT-CGX(+5)T
	ssDNA	ODN11	5' -F1CGT-CGT-CGT-CGT-CGT-CGXT
dsDNA	dsDNA +AEA	ODN12+5 ODN13	5' -CGT-CGT-CGT-CGT-CGT-CGX(+5)T 3' -F1GCA-GCA-GCA-GCA-GCA-GCAA
	dsDNA	ODN12 ODN13	5' -CGT-CGT-CGT-CGT-CGT-CGXT 3' -F1GCA-GCA-GCA-GCA-GCA-GCAA
siRNA	siRNA +AEA	ORN01+5 ORN02	5' -GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CTX(+5) 3' -CCG-GAA-AGU-GAU-GAG-GAU-GTTTF1
	siRNA	ORN03 ORN02	5' -GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CTT 3' -CCG-GAA-AGU-GAU-GAG-GAU-GTTTF1

Tabelle 3.2: Einzelsträngige (ss) und doppelsträngige (ds) DNA und siRNA mit und ohne AEA-Modifikation mit den zugehörigen Sequenzen. AEA-Modifikation durch Cycloaddition von AEA-Azid **5** an Oktadiinyl-desoxyuridin **X**. F1 = Fluorescein, N = Desoxyribonukleosid, N = Ribonukleosid.

Die Konstruktion eines AEA-modifizierten siRNA-Duplexes erfolgte analog zum DNA-Duplex: Zuerst wurde der kommerziell erhältliche RNA-Einzelstrang ORN01 mit Oktadiinyl-Desoxyuridin an der ersten Position durch Click-Reaktion mit AEA-Azid **5** modifiziert und anschließend mit dem RNA-Gegenstrang ORN02 hybridisiert. Durch die Positionierung des Farbstoff-Moleküls im Gegenstrang des AEA-modifizierten Strangs sollte eine Detektion der vollständigen Duplexe nach der Aufnahme in die Zelle gewährleistet werden. Tabelle 3.2 fasst die verwendeten Oligonukleotide sowie die einzelsträngigen und doppelsträngigen AEA-Oligonukleotide zusammen. Ebenfalls aufgeführt sind die zugehörigen Negativkontrollen ohne AEA-Modifikation.

3.3 Aufnahmestudien mit Anandamid-modifizierten Oligonukleotiden

Als Modellsystem für die Aufnahme der AEA-modifizierten Oligonukleotide wurde die Zelllinie RBL-2H3 (rat basophilic leukemia) gewählt. Bei diesen adhärenenten Zellen der Spezies *Rattus norvegicus* handelt es sich um Mastzellen mit Fibroblasten-ähnlicher Morphologie.^[211] Mastzellen sind multifunktionale Immunzellen und spielen eine wichtige Rolle bei Überempfindlichkeit und Entzündungen.^[8] Sie sind im Bindegewebe zahlreicher Organe, in serösen Höhlen und im Nervensystem lokalisiert.^[212] Da RBL-2H3 Zellen alle notwendigen biochemischen Werkzeuge für die Biosynthese, Erkennung, Aufnahme und Verstoffwechselung von Endocannabinoiden besitzen, dienten sie für zahlreiche Studien als Modellsystem bezüglich der Aufnahme von AEA.^[7b, 9] Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Aufnahme-Studien wurden unter Verwendung eines konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskops durchgeführt. Dieses Mikroskop besitzt gegenüber gewöhnlichen Lichtmikroskopen den großen Vorteil, dass sich damit optische Schnitte von Proben aufnehmen lassen, wodurch Untersuchungen von Prozessen im Inneren von Objekten ermöglicht werden. Dazu wird der abzubildende Bereich durch die konfokale Platzierung zweier Lochblenden im Strahlengang der Anregung und der Detektion des Mikroskops auf den Fokuspunkt begrenzt. Das *scannen* einer Ebene im Fokuspunkt mittels einer Rasteroptik führt dann zu einem optischen Schnitt.

Für die Aufnahme-Studien wurden die adhärenenten RBL-2H3 Zellen in 8-*well* Platten inkubiert und mit den in Kapitel 3.1 und 3.2 synthetisierten AEA-Oligonukleotiden versetzt. Anschließend wurde die Aufnahme der AEA-Oligonukleotide in die Zellen unter dem Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Die Studien wurden in vollständigem Wachstumsmedium als Duplikate über einen Zeitraum von acht Stunden durchgeführt. Als absolute Referenz wurden die Zellen ohne Zugabe von Oligonukleotiden beobachtet. Parallel dazu wurden zu den Zellen die Fluorescein-markierten AEA-Oligonukleotide gegeben. Als Negativ-Kontrolle dienten die korrespondierenden Fluorescein-markierten Oligonukleotide ohne AEA-Modifikation. Die Konzentration der Oligonukleotide wurde dabei stets auf 500 nM eingestellt. Diese Konzentration erlaubte zum Einen die aussagekräftige Qualifizierung der Aufnahme anhand der resultierenden Fluoreszenz und zum Anderen stellte dies eine realistische Konzentration für spätere Aktivitäts-Studien mit siRNA dar. Fluorescein ($\lambda_{\text{max}}(\text{Abs}) = 492 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max}}(\text{Em}) = 517 \text{ nm}$) wurde mit Laserlicht der Wellenlänge 488 nm angeregt und die resultierende Emission im Bereich 500 nm bis 550 nm detektiert.

Im Rahmen dieser Studien wurde die Aufnahme der Oligonukleotide in die Zellen ausschließlich qualitativ bewertet, da während einer Messung nicht die gesamte Fluoreszenz, sondern lediglich die Fluoreszenz einer optischen Ebene erfasst wurde. Prinzipiell ließe sich die Detektion durch ein Raster dieser Ebene auf einen dreidimensionalen Raum erweitern und so die gesamte Fluoreszenz erfassen. Die Lokalisierung der Anregung in den Fokuspunkt führt allerdings aufgrund der hohen Energiedichte zu einem raschen Ausbleichen des angeregten Fluorophors und verfälscht dadurch eine akkurate Quantifizierung der detektierten Fluoreszenz. Die Quantifizierung der Aufnahme erfolgte deshalb im Rahmen der Aktivitäts-Studien im folgenden Kapitel. Für eine Bewertung der Lokalisierung der aufgenommenen Oligonukleotide ist anzumerken, dass während der Messung lediglich der Fluorophor detektiert wurde. Es ist nicht auszuschließen, dass die Oligonukleotide zum Zeitpunkt der Messung bereits durch DNasen bzw. RNasen hydrolysiert wurden und das gemessene Signal allein dem Fluorophor ohne Oligonukleotid entsprach. Die Fluoreszenz innerhalb der Zellen lässt sich je-

doch der Aufnahme intakter Oligonukleotide zuordnen. Wie schon in Kapitel 3.2 aufgeführt, wurde bei den Duplexen durch Positionierung des Fluoresceins am Gegenstrang des AEA-modifizierten Strangs eine Detektion der vollständigen aufgenommenen Duplexe gewährleistet.

Die Resultate der mikroskopischen Untersuchungen sind zusammenfassend in Abbildung 3.2 dargestellt. Von links nach rechts sind jeweils der Durchlichtkanal, der Fluoreszenzkanal und die Überlagerung beider Kanäle dargestellt. Die Zugabe von AEA-modifizierten Oligonukleotiden führte zu einer intensiven Fluoreszenz innerhalb der Zellen und belegt damit die effiziente Aufnahme der Oligonukleotide durch die Zellen. Die Negativkontrollen mit Oligonukleotiden ohne AEA-Modifikation wiesen keinerlei Fluoreszenz im Inneren der Zellen auf. Daraus lässt sich schließen, dass die Oligonukleotide ohne AEA-Modifikation von den Zellen nicht aufgenommen wurden. Zusammenfassend kann dies als eine AEA-vermittelte Aufnahme der Oligonukleotide interpretiert werden.

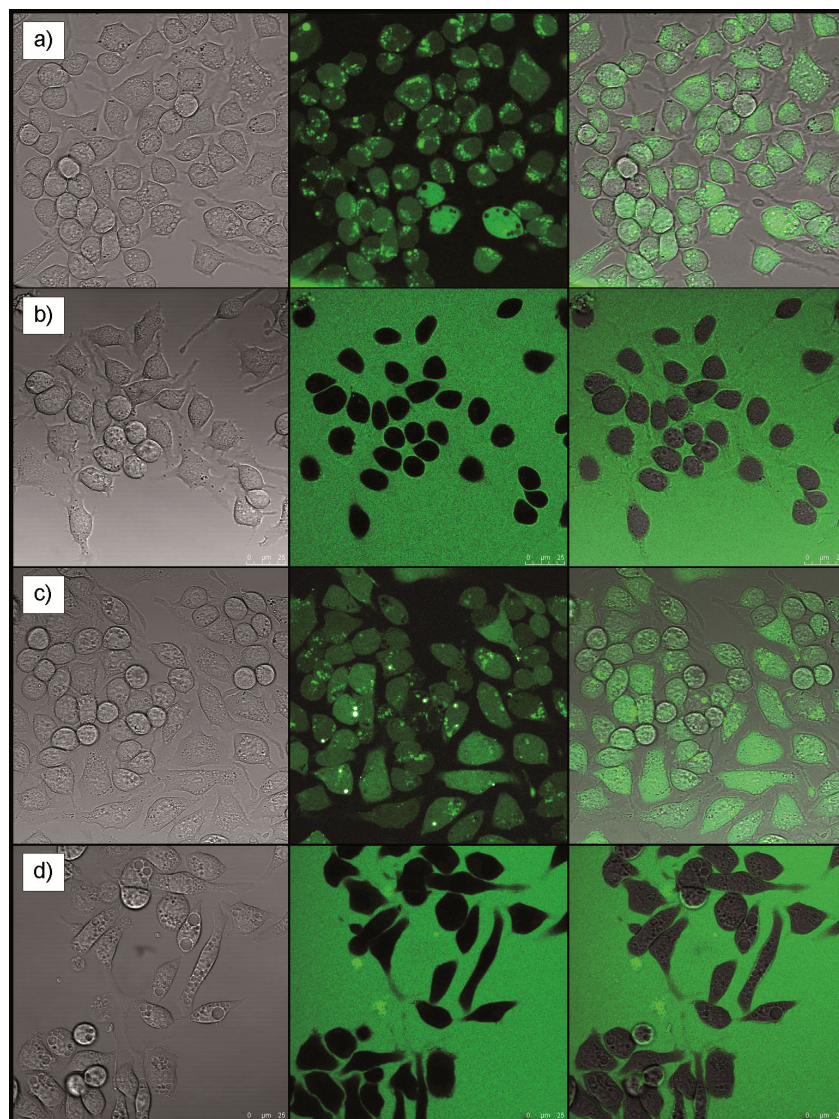


Abbildung 3.2: Aufnahme-Studien mit AEA-modifizierten Oligonukleotiden in RBL-2H3 Zellen. 1. Spalte: Durchlichtkanal, 2. Spalte: Fluoreszenzkanal, 3. Spalte: Überlagerung beider Kanäle. **a)** dsDNA+AEA, **b)** dsDNA **c)** siRNA+AEA, **d)** siRNA.

Bezüglich der Länge der Oligonukleotide ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Aufnahmefähigkeit feststellen: Die doppelsträngige DNA bestehend aus 19 Nukleotiden wurde in gleichem Maße wie das Thymidin-Dinukleotid aufgenommen. Diese Beobachtung war ebenfalls für den siRNA-Duplex gültig. Die Aufnahme AEA-modifizierter Oligonukleotide scheint demnach für DNA und RNA identisch zu verlaufen. Die detektierte Verteilung innerhalb der Zellen deckt sich mit den Ergebnissen von *Maccarrone* unter Verwendung des Biotin-AEA^[203-204] und lässt auf eine freie Verfügbarkeit der Oligonukleotide im Cytosol schließen. Auch *Maccarrone* konnte eine weitgehend homogene Verteilung innerhalb der Zellen und innerhalb des Zellkerns beobachten. Die hier detektierte intensive Fluoreszenz einzelner Kompartimente deckt sich ebenfalls mit den Ergebnissen von *Maccarrone*: Im Falle des Biotin-AEA konnten diese Kompartimente als Fettvesikel (Adiposome) identifiziert werden.^[204] Es könnte sich allerdings bei den hier detektierten Kompartimenten mit intensiver Fluoreszenz ebenso um Endosome handeln. Biotin-AEA besitzt aufgrund seines ausgeprägt hydrophoben Charakters ein klares Bestreben zur Anreicherung in Fettvesikeln. Dieses Bestreben kann den AEA-modifizierten Oligonukleotiden nicht zugeschrieben werden. Aus diesem Grund lassen sich die Ergebnisse von *Maccarrone* nicht direkt auf die hier durchgeführten Messungen übertragen. Die von *Maccarrone* durchgeführte Zuordnung der Kompartimente als Adiposome durch Verwendung des selektiven Farbstoffs Phenoxazinfarbstoffs *Nile Red* war hier leider nicht möglich: Die Zuordnung von Adiposomen durch *Nile Red* anhand der Emission weist die höchste Selektivität bei 528 nm auf. Bei dieser Wellenlänge kann jedoch nicht eindeutig zwischen der Emission von *Nile Red* und Fluorescein unterschieden werden, da Fluorescein ($\lambda_{\text{max}}(\text{Em}) = 517 \text{ nm}$) hier ebenfalls eine intensive Emission aufweist.

Zusammenfassend konnte erstmals die Verwendung von AEA als Transportvehikel für die Aufnahme von Oligonukleotiden in Immunzellen experimentell bestätigt werden. AEA ist in der Lage, Oligonukleotide unterschiedlicher Länge bis hin zu einem siRNA-Duplex in die Zellen zu transportieren. Nach dem Abschluss der Aufnahmestudien wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die aufgenommene siRNA weiterhin zur Regulation eines Gens fähig sein würde. Die Ergebnisse dieser Aktivitäts-Studien werden im folgenden Kapitel vorgestellt.

4 RNA-Interferenz durch Anandamid-modifizierte siRNA in Immunzellen

Nachdem die Verwendung von AEA als Transportvehikel für die Aufnahme von siRNA in Immunzellen erfolgreich gezeigt werden konnte, sollte nun untersucht werden, inwieweit die siRNA zur Regulation eines Gens fähig wäre. Zu diesem Zweck wurden die Mastzellen RBL-2H3 mit einer *Renilla* Luciferase transfiziert und diese anschließend durch AEA-modifizierte siRNA reguliert. Im Rahmen dieser Studien wurden diverse Ansätze verfolgt, um eine bestmögliche Effektivität der aufgenommenen siRNA zu gewährleisten. Hierfür wurde die Stabilität, die intrazelluläre Verfügbarkeit und die Aufnahme der modifizierten siRNA optimiert. Dieses Kapitel beschreibt die Synthese der modifizierten Luciferase siRNA und deren Verwendung zur Regulation einer *Renilla*-Luciferase in RBL-2H3 Zellen. In diesem Zusammenhang werden auch diverse Ansätze zur Optimierung der RNA-Interferenz vorgestellt.

4.1 Synthese modifizierter Luciferase-siRNA

Die Modifikation der siRNA mit AEA sollte analog zu Kapitel 2 unter Verwendung des AEA-Azids **5** mittels Click-Chemie erfolgen. Da das 3'-Ende des *sense*-Strangs die größte Toleranz gegenüber Modifikationen aufweist,^[61-62, 62d, 67] wurde die zweite Position des dTdT-Überhangs durch ein Alkinnukleotid ersetzt. Ein entscheidender Vorteil dieser Strategie liegt darin, dass diese sequenzunabhängige Position die Modifikation jeder beliebigen siRNA ermöglicht. Wie in der Einleitung aufgeführt, lässt sich die Effektivität der siRNA durch die Verwendung von modifizierten Basen optimieren. Aus diesem Grund wurde neben nativer siRNA ebenfalls stabilisierte siRNA synthetisiert. Für die Stabilisierung der siRNA wurden 2'-Fluoro Nukleotide gewählt, da diese die Stabilität und die Nuklease-Resistenz der siRNA erhöhen und gleichzeitig weitgehend durch den *RISC* toleriert werden.^[64, 69]

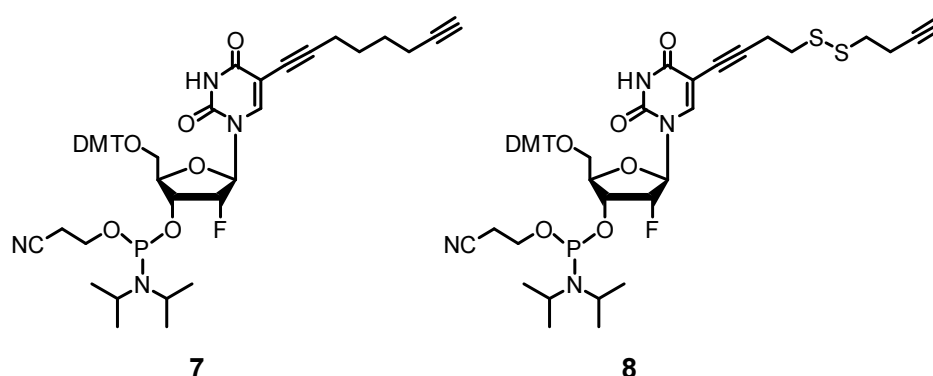


Abbildung 4.1: Synthetisierte Alkinnukleotidphosphoramidite 2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridinphosphoramidit **7** und 2'-Fluoro-Disulfanyloktadiinyl-Uridinphosphoramidit **8**. Der Einbau dieser Nukleotide an der zweiten Position des *sense*-Strangs ermöglicht die postsynthetische Modifikation der siRNA mittels Click-Chemie.

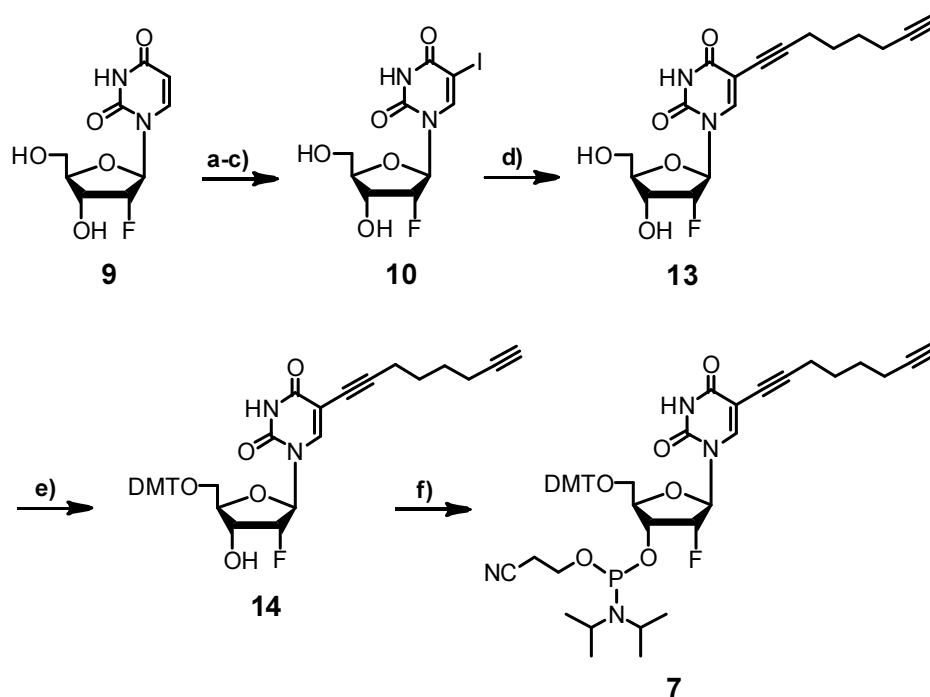
Zur Modifikation der siRNA mit einem Alkinnukleotid während der Festphasensynthese wurde das ebenfalls stabilisierte 2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridinphosphoramidit **7** synthetisiert. Die Stabilisierung dieses Nukleotids ist von entscheidender Bedeutung, da eine Abspaltung vor der Aufnahme in die Zelle zu einem Verlust der AEA-Modifikation führen würde und somit die Aufnahme durch die Zellen nicht länger möglich wäre. Nach der Aufnahme in die Zelle könnte die AEA-Modifikation allerdings einen negativen Einfluss auf die siRNA ausüben: Die intrazelluläre Bindung durch das AEA-Transporterprotein FLAT oder unspezifische Fettsäurebindepoteine sowie die Einlagerung in Endosomen oder Lagervesikeln (z.B. Adiposome) könnten die Verfügbarkeit der siRNA beeinträchtigen und dadurch deren Aktivität reduzieren. Eine Bindung durch die Hydrolase FAAH ist ebenfalls nicht auszuschließen, da schon die AEA-Aufnahmesonden SKM4-45-1 von Hillard^[202b] und Biotin-AEA von Maccarrone^[203-204] nicht durch FAAH hydrolysiert werden konnten. Aus diesem Grund wurde neben 2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridinphosphoramidit **7** zusätzlich 2'-Fluoro-Disulfanyloktadiinyl-Uridinphosphoramidit **8** synthetisiert. Bei diesem Uridinderivat ist die Alkinmodifikation über eine Disulfidbrücke mit dem Nukleotid verbunden. Aufgrund der vorherrschenden reduktiven Bedingungen innerhalb der Zelle sollte sich diese Disulfidbrücke nach erfolgreicher Aufnahme der AEA-modifizierten siRNA öffnen und dadurch eine optimale Verfügbarkeit und somit eine optimale Aktivität der siRNA gewährleisten.^[122] Die folgenden Kapitel stellen detailliert die Synthese der beiden in Abbildung 4.1 aufgeführten Phosphoramidite vor. Anschließend wird deren Verwendung zur Festphasensynthese modifizierter RNA beschrieben.

4.1.1 Synthese von 2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridinphosphoramidit **7**

2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridinphosphoramidit **7** wurde ausgehend von dem kommerziell erhältlichen Nukleosid 2'-Fluorouridin **9** über vier Stufen synthetisiert. Die zugehörige Synthese ist in Schema 4.1 dargestellt. Nach elektrophiler Substitution des Uracil-Rings mit Iod konnte das Nukleosid **10** mittels *Sonogashira*-Kreuzkupplung^[213] mit Oktadiin funktionalisiert werden, um nach Tritylschätzung der 5'-Hydroxygruppe das Oktadiinyl-Uridinphosphoramidit **7** zu bilden. Die Substitution der C5-Position des Uracilrings mit Iod erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von Asakura und Robins.^[214] Hierbei oxidiert das Oxidationsmittels Cerammoniumnitrat elementares Iod *in situ* zum Iodonium-Ion, welches dann selektiv an der C5-Position des Uracilrings angreift. Im Vergleich zu anderen Vorschriften in der Literatur^[215] versprach diese Methode die höchsten Ausbeuten. Aufgrund der geringen Löslichkeit von 2'-Fluorouridin **9** wurden die 3'- und 5'-Hydroxygruppe vor der Iod-Substitution mit Essigsäureanhydrid in Pyridin acetyliert. Das acetylierte 2'-Fluorouridin **11** wies allerdings ebenfalls nur mäßige Löslichkeit in gängigen Lösungsmitteln auf. Zur Aufarbeitung wurde daher das überschüssige Essigsäureanhydrid mit Methanol abreagiert, um neben Produkt **11** ausschließlich flüchtige Komponenten zu generieren. Im Anschluss an die Substitution mit Iod wurde das acetylierte 2'-Fluoroioduridin **12** in Anwesenheit von Ammoniak in Methanol zu 2'-Fluorioduridin **10** entschützt.

Die Palladium-katalysierte *Sonogashira*-Kreuzkupplung^[213] zwischen 2'-Fluorioduridin **10** und Oktadiin wurde nach einer leicht modifizierten Synthese von Seela und Sirivolu^[216] durchgeführt. Durch einen zehnfachen Überschuss an Oktadiin wurde gewährleistet, dass sich als Hauptprodukt das monofunktionalisierte Oktadiinyluridin **13** in sehr guter Ausbeute bildete. Im Anschluss an die Kreuzkupplung erfolgte die Schätzung der 5'-Hydroxygruppe mit Dimethoxytritylchlorid zur Generierung von Nukleosid **14**. Aufgrund der sterisch anspruchsvollen 3'-Hydroxygruppe verläuft diese Reaktion nahezu vollständig regioselektiv. Um die Regioselektivität der Reaktion weiter zu unterstützen, wurde das

Dimethoxytritylchlorid portionsweise bei 0°C zugegeben. Die chromatographische Aufreinigung erfolgte über Triethylamin-passiviertem Silica, um eine Abspaltung der Dimethoxytrityl-Gruppe auf der sauren Silica-Oberfläche zu unterdrücken. Im finalen Schritt wurde das Nukleosid **14** mit 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphordiamidit (CEDCI) zum entsprechenden Phosphoramidit **7** funktionalisiert. Das Produkt **7** wurde chromatographisch über Triethylamin-passiviertem Silica mit entgasstem Laufmittel aufgereinigt, um eine Entschützung der Dimethoxytritylgruppe und eine Oxidation der Phosphoramiditfunktionalität zu verhindern.

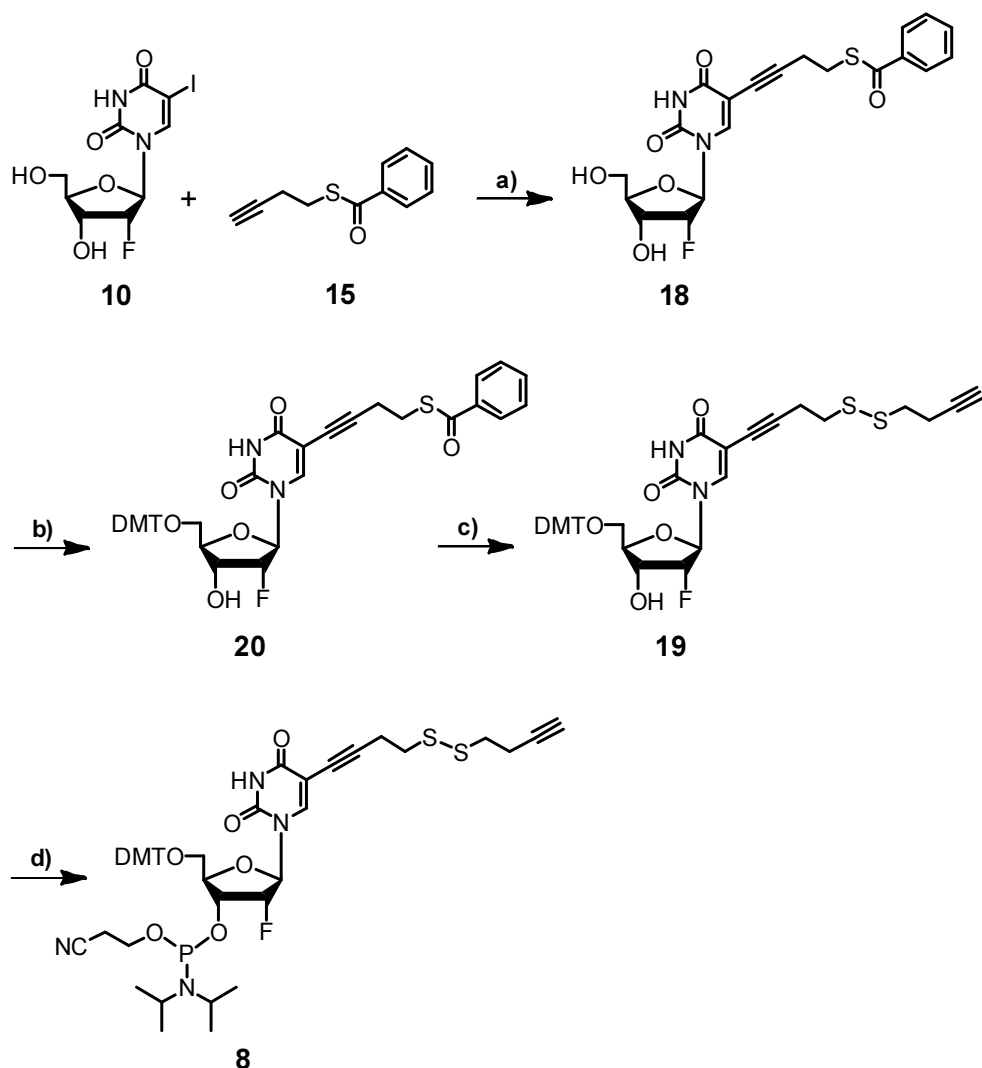


Schema 4.1: Synthese von 2'-Fluoro-Oktadiynyl-Uridinphosphoramidit **7** ausgehend von 2'-Fluorouridin **9**. a) Ac_2O , 1 h, 0 °C, 97 %, b) I_2 , CAN, 1.5 h, 90 °C, 93 %, c) NH_3/MeOH 7N, 24 h, RT, quant., d) Oktadiin, $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, CuI, DIPEA, DMF, 16 h, RT, 89 %, e) DMTCl, DMAP, Pyridin, 4 h, 0 °C -> RT, 81 %, f) CEDCI, DIPEA, DCM, 3 h, RT, 93 %.

4.1.2 Synthese von 2'-Fluoro-Disulfanyloktadiynyl-Uridinphosphoramidit **8**

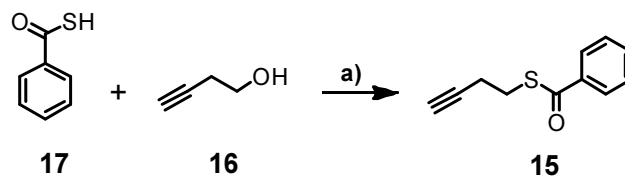
Die Synthese des 2'-Fluoro-Disulfanyloktadiynyl-Uridinphosphoramidits **8** wurde analog der Synthese des 2'-Fluoro-Oktadiynyl-Uridinphosphoramidits **7** geplant. Eine *Sonogashira*-Kreuzkupplung^[213] mit dem entsprechenden Disulfanyloktadiin im Überschuss war allerdings nicht möglich, da das Disulfid den Palladium(0)-Katalysator zu Palladium(II) oxidieren würde. Es wurde daher versucht, But-1-in-4-thiol mit 2'-Fluoro-Ioduridin **10** zu kuppeln, um in einer Folgereaktion unter Verwendung eines zweiten Äquivalents But-1-in-4-thiol das gewünschte Disulfanyloktadiin-Nukleosid zu erhalten. Eine direkte Kupplung mit But-1-in-4-thiol war allerdings nicht möglich, da dieses ebenfalls als Katalysatorgift fungiert.^[217] Darüber hinaus ist But-1-in-4-thiol eine flüchtige und übel riechende Substanz. Aus diesen Gründen wurde die Synthese und weitere Umsetzung von But-1-in-4-thiol umgangen und stattdessen der korrespondierende Thioester But-3-inylnbenzothioat **15** verwendet. Hier wird das Schwefelatom durch den sterisch anspruchsvollen Ester gut abgeschirmt und somit die Vergiftung des Palladium(0)-Katalysators weitgehend unterdrückt. Der Siedepunkt wird ebenfalls stark erhöht und da-

mit die Synthese und Handhabung wesentlich erleichtert. Die vollständige Synthese des Disulfanyl-oktadiinyl-Uridinphosphoramidits **8** unter Verwendung von But-3-inylnbenzothioat **15** zeigt Schema 4.2.



Schema 4.2: Synthese von 2'-Fluoro-Oktadiinylbisulfanyl-Uridinphosphoramidit **8** ausgehend von 2'-Fluoro-Ioduridin **10** und But-3-inylnbenzothioat **15**. a) $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, CuI, DIPEA, DMF, 16 h, 40 °C, 81 %, b) DMTCl, DMAP, Pyridin, 4 h, 0 °C -> RT, 75 %, c) But-3-inylnbenzothioat **15**, NH_3/MeOH , I_2 , 16 h, RT, 37 %, d) CEDCl, DIPEA, DCM, 3 h, RT, 82 %.

But-3-inylnbenzothioat **15** wurde in einer *Mitsunobu*-Reaktion aus But-3-in-1-ol **16** und Thiobenzoesäure **17** nach einer Vorschrift von Benner^[218] synthetisiert (Schema 4.3). Benner verwendete But-3-inylnbenzothioat **15** ebenfalls für eine *Sonogashira*-Kreuzkupplung^[213] an 5-Iodopyrimidin. Die Bedingungen für die Synthese des Nukleosids **18** konnten somit ebenfalls dieser Literatur^[218] entnommen werden. Für die Kreuzkupplung ist anzumerken, dass diese Reaktion nur bei Ausschluss von Licht zum Produkt **18** führte.



Schema 4.3: Synthese von But-3-ynylbenzothioat **15** ausgehend von But-3-in-1-ol **16** und Thiobenzoessäure **17**. a) DIAD, PPh₃, THF, 16 h, RT, 95 %.

Um die Entschützung des Benzothioesters von Nukleosid **18** und die Bildung des Disulfanyloktadiinyl-Nukleosids **19** besser analytisch verfolgen zu können, wurde die Dimethoxytrityl-Schutzgruppe bereits an dieser Stelle der Synthese in das Molekül eingefügt. Analog der Synthese von Nukleosid **14** konnte unter Verwendung von Dimethoxytritylchlorid das Nukleosid **20** in guter Ausbeute isoliert werden. Auch hier verlief die Reaktion vollständig regioselektiv. Für die Bildung des Disulfanyloktadiinyl-Nukleosids **19** wurde das Benzothioyl-Nukleosid **20** zusammen mit zehn Äquivalenten But-3-ynylbenzothioat **15** in Ammoniak/Methanol entschützt und anschließend *in situ* mit elementarem Iod zum Disulfanyloktadiinyl-Nukleosids **19** oxidiert. Durch den zehnfachen Überschuss an But-3-ynylbenzothioat **15** wurde gewährleistet, dass sich während der Oxidation bevorzugt das asymmetrische Disulfid **19** ausbildete. Die geringe Ausbeute für die Synthese des Disulfanyloktadiinyl-Nukleosids **19** von 37 % begründete sich in dessen aufwändiger Isolation: Die Polarität des Eduktes **19** und sämtlicher Reaktionsprodukte wurden maßgeblich durch das Uridin-Gerüst dominiert und führten dadurch zu einer nahezu identischen Retentionszeit aller Spezies während der chromatographischen Aufreinigung in diversen Laufmittelgemischen. Letztendlich konnte das Produkt **19** nur durch ein Vierkomponenten-Gemisch bestehend aus Ethylacetat, Dichlormethan, Isohexan und Triethylamin nach zweifacher chromatographischer Aufreinigung isoliert werden. Wie schon im Falle des Oktadiinyl-Nukleosids wurde das Disulfanyloktadiinyl-Nukleosid **19** im finalen Schritt mit 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphordiamidit (CEDCI) zum entsprechenden Phosphoramidit **8** funktionalisiert. Das Produkt **8** wurde ebenfalls über Triethylamin-passiviertem Silica mit entgastem Laufmittel aufgereinigt, um eine Entschützung der Dimethoxytritylgruppe und eine Oxidation der Phosphoramiditfunktionalität zu verhindern.

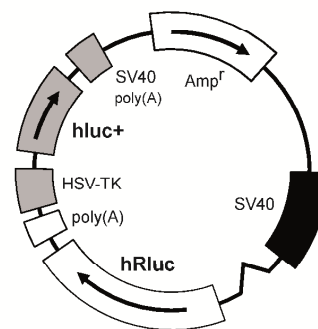
4.1.3 RNA Festphasensynthese

Das folgende Kapitel beschreibt die Festphasensynthese unterschiedlich modifizierter siRNA-Duplexe zur spezifischen Regulation einer *Renilla*-Luciferase. Wie zu Beginn des Kapitels erläutert, sollte dadurch die Aktivität der aufgenommenen siRNA quantifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden die adhären Mastzellen RBL-2H3 mit dem Plasmidvektor psiCHECK™-2 transfiziert. Dieser Vektor trägt die genetische Information für eine *Firefly*-Luciferase und eine *Renilla*-Luciferase. In Abbildung 4.2 ist die Vektorkarte des verwendeten Plasmidvektors psiCHECK™-2 zusammen mit der sequentiellen Zuordnung der strukturellen Bestandteile dargestellt. Für die Regulation der darin kodierten *Renilla*-Luciferase wurde vom Hersteller als effektivste siRNA eine komplementäre Sequenz zur Position 1068 bis 1086 vorgegeben, welche zur Veranschaulichung rot hervorgehoben ist. Die daraus resultierende LUC-siRNA ist ebenfalls in Abbildung 4.2 dargestellt.

Die Synthese dieser LUC-siRNA erfolgte unter Verwendung von 2'-Thiomorpholin-4-carbothioat RNA-Phosphoramiditen (TC RNA-Synthese). Diese Amidite besitzen laut Hersteller gegenüber herkömmlichen 2'-*tert*-Butyldimethylsilylether RNA-Phosphoramiditen (TBDMS RNA-Synthese) neben höheren Kupplungsausbeuten den Vorteil, dass die synthetisierte RNA in einem einzigen Schritt geschützt werden kann.^[219] Der Einbau der synthetisierten Alkinnukleoside 2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridinphosphoramidit **7** und 2'-Fluoro-Disulfanyloktadiinyl-Uridinphosphoramidit **8** erfolgte jeweils an der zweiten Position des 3'-Überhangs. Sämtliche Synthesen wurden unter Verwendung eines dT-CPG Trägermaterials durchgeführt.

psiCHECK(TM)-2 Vektor (6273 BP)

Basenpaare	6273
SV40 Promoter	7-425
Chimerisches Intron	489-621
T7 RNA Polymerase Promoter	666-684
Synthetisches Renilla-Luciferase Gen (hRluc)	694-1629
Multiple Klonierungsregion	1636-1680
Synthetischer poly(A)	1688-1736
HSV-TK Promoter	1744-2496
Synthetisches Firefly-Luciferase Gen (hluc+)	2532-4184
SV40 Später poly(A)	4219-4440
Beta-Lactamase (Amp ^r) Kodierungsregion	4587-5447



951	GAGCGGGAAT	GGCTCATATC	GCCTCCTGGA	TCAC TACAAG	TACCTCACCG
1001	CTTGGTTCGA	GCTGCTGAAC	CTTCCAAAGA	AAATCATCTT	TGTGGGCCAC
1051	GACTGGGGGG	CTTGTCTGGC	CTTTCACTAC	TCCTACGAGC	ACCAAGACAA
1101	GATCAAGGCC	ATCGTCCATG	CTGAGAGTGT	CGTGGACGTG	ATCGAGTCCT
1151	GGGACGAGTG	GCCTGACATC	GAGGAGGATA	TCGCCCTGAT	CAAGAGCGAA

Gen	5'	GGC CTT TCA CTA CTC CTA C
mRNA	5'	GGC CUU UCA CUA CUC CUA C
LUC-siRNA	5'	GGC CUU UCA CUA CUC CUA CTT <i>sense</i>
	3'	TT CCG GAA AGU GAU GAG GAU G <i>antisense</i>

Abbildung 4.2: Vektorkarte des Plasmidvektors psiCHECK™-2 mit sequentieller Zuordnung der strukturellen Bestandteile. Der Sequenzabschnitt 951 bis 1200 innerhalb des *Renilla*-Luciferase Gens zeigt rot hervorgehoben die komplementäre Sequenz der LUC-siRNA beginnend an Position 1068. Die daraus resultierende LUC-siRNA zur selektiven Regulation der *Renilla*-Luciferase ist darunter aufgeführt.

Zusätzlich zu den Standard-Nukleosiden dienen 2'-Fluoro-Nukleoside zur Erhöhung der Stabilität und der Nuklease-Resistenz der RNA.^[64, 69] Da sich die Nukleaseresistenz von siRNA generell am effektivsten durch Stabilisierung der Pyrimidin Nukleoside erhöhen lässt,^[63a, 64, 220] wurde die siRNA durch 2'-Fluoro-Uridin und 2'-Fluoro-Cytidin stabilisiert. *Liang* konnte zeigen, dass die Spaltung von siRNA durch RNasen besonders häufig an den Sequenzmotiven *UA/UA* und *CA/UG* erfolgt.^[221] Aus diesem Grund wurden diese Motive bezüglich der Stabilisierung berücksichtigt. Da eine Modifikation des *antisense*-Strangs nur bedingt durch den *RISC* toleriert wird,^[46b, 47c, 54, 62a, 66-67] wurde dieser lediglich geringfügig an den Enden stabilisiert.

Der *antisense*-Strang wurde ohne Alkinmodifikation (ORN04) und mit 2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridinphosphoramidit **7** (ORN05) synthetisiert. Für den *sense*-Strang wurden drei verschiedene Varianten mit zunehmender Anzahl an 2'-Fluoro-Nukleosiden unter Verwendung von 2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridinphosphoramidit **7** synthetisiert (ORN06-08). Dadurch sollte der Einfluss zunehmender Duplexstabilität auf die resultierende Effektivität eingehender untersucht werden. Der Einbau der stabilisierenden 2'-Fluoro-Nukleoside erfolgte verteilt über den Strang, da *Choi* zeigen konnte, dass ein blockweiser Einbau die Aktivität der siRNA verstärkt reduziert.^[220] Die synthetisierten Oligonukleotide sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Dabei wurde die Aufreinigung und die zugehörige Analytik aller Oligonukleotide von *Johannes Harder*^[222] durchgeführt.

Bezeichnung	Strang	Sequenz 5' → 3'
LUC-antisense1	ORN04	<i>GUA-GGA-GUA-GUG-AAA-GGC-CUT</i>
LUC-antisense2	ORN05	<i>GUA-GGA-GUA-GUG-AAA-GGC-CXT</i>
LUC-sense1	ORN06	<i>GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CXT</i>
LUC-sense2	ORN07	<i>GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CXT</i>
LUC-sense3	ORN08	<i>GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CXT</i>

Tabelle 4.1: Synthetisierte *antisense*- und *sense*-Stränge der LUC-siRNA mit den zugehörigen Sequenzen unter Verwendung des 2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridinphosphoramidits **7**. N = 2'-Desoxynukleosid, N = 2'-Hydroxynukleosid, N = 2'-Fluoronukleosid, X = 2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridin.

Die Festphasensynthese unter Verwendung der TC-Amidite verlief wie vom Hersteller angegeben mit exzellenten Kupplungseffizienzen. Die einstufige Entschützung mit Ethylendiamin lieferte allerdings nicht die erwartete Qualität der Oligonukleotide. Neben den gewünschten Produkten ließ sich stets ein Nebenprodukt detektieren, welches die Produktmasse um 20 atomare Einheiten überschritt. Dieses Nebenprodukt entstand bei jeder Entschützung zu ungefähr 40 % und reduzierte damit die Ausbeuten erheblich. Wiederholte Kommunikation mit dem Hersteller und intensives optimieren der Entschützungsbedingungen hinsichtlich Temperatur und Zeit konnte die Entstehung des Nebenprodukts nur marginal reduzieren. Während dieser Optimierung konnte beobachtet werden, dass sich die Entschützung sehr sensitiv gegenüber Temperaturabweichungen und Feuchtigkeit verhielt. Neben diesem Nebenprodukt ließen sich weitere Nebenprodukte detektieren, welche aufgrund ihrer Masse als Zersetzungsprodukte während der Entschützung und nicht als Abbruchfragmente während der Festphasensynthese zugeordnet werden konnten. Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass die TC-Amidite die Erwartungen nicht erfüllten und aufgrund der sensitiven Entschützung keinen klaren Vorteil gegenüber den herkömmlichen TBDMS-Amiditen besitzen.

Die synthetisierten Phosphoramidite **7** und **8** konnten mit hervorragender Effizienz während der Festphasensynthese gekuppelt werden. Jedoch ließ sich unter Verwendung des 2'-Fluoro-Disulfanyloktadiinyl-Uridinphosphoramidits **8** für die synthetisierten Oligonukleotide nahezu kein Produkt isolieren. Das Phosphoramidit **8** schien demnach ungeachtet der effizienten Kupplung ungeeignet für die Synthese der geplanten Oligonukleotide. Eine Massenanalyse der entstandenen Hauptprodukte ergab, dass das Alkindisulfid fast vollständig zum entsprechenden Thiol gespalten wurde. Eine Oxidation des Disulfids zum korrespondierenden Thiolo-sulfonat, Thiolo-sulfonat oder Disulfon und eine oxidative Spaltung zu den entsprechenden Sulfonsäuren waren daher nicht die Ursachen des fehlenden Produktes.^[223] Die Spaltung eines Disulfids zum Thiol kann prinzipiell durch eine Reduktion, den Angriff eines Nukleophils oder eine Disproportionierung zu Thiol und Sulfensäure erfolgen (siehe Abbildung 4.3).^[223-224] Die Disproportionierung konnte in diesem Fall jedoch als unwahrscheinlich angesehen werden, da diese nahezu ausschließlich in Anwesenheit von Radikalen erfolgt.^[224] Als mögliche Nukleophile kämen Iodid während den Oxidationsschritten der Festphasensynthese oder Ethylen-diamin während der Entschützung am Ende der Festphasensynthese in Frage. Die Reduktion des Disulfids könnte in Anwesenheit der Phosphoramidite erfolgt sein, welche während der Festphasensynthese in hohem Überschuss und in hoher Konzentration vorlagen. Innerhalb der Festphasensynthese musste das Disulfid 20 Syntheszyklen durchlaufen. Daher war eine partielle Spaltung über die Syntheszyklen verteilt ebenfalls nicht auszuschließen.

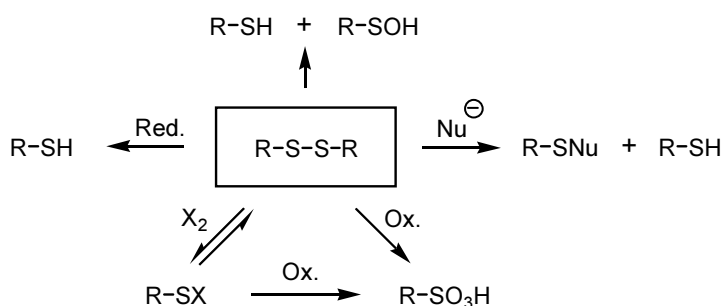


Abbildung 4.3: Mögliche Reaktionswege zur Spaltung von Disulfiden.

Um die Ursache für die Spaltung einzugrenzen, wurde das 2'-Fluoro-Disulfanyloktadiinyl-Uridinphosphoramidits **8** anstelle der zweiten Position an der letzten Position eines Oligonukleotids gekuppelt. Dadurch musste das Disulfid lediglich einen Zyklus der Festphasensynthese durchlaufen. Da für die Toleranz von Disulfiden bezüglich der TC-RNA Chemie nur interne Daten des Herstellers vorlagen, erfolgte die Kupplung endständig an einen DNA-Strang. Diese Maßnahmen sollten zeigen, ob ein erfolgreicher Einbau des 2'-Fluoro-Disulfanyloktadiinyl-Uridinphosphoramidits **8** prinzipiell möglich war. Diese Strategie lieferte ca. 80 % Oligonukleotid mit intaktem Disulfid und ca. 20 % Oligonukleotid mit dem entsprechenden Thiol und belegte damit die prinzipiell mögliche Verwendung des Amidits **8** während der Festphasensynthese. Die geplante Verwendung des Amidits **8** innerhalb der siRNA war damit jedoch vorerst ausgeschlossen: Wie oben im Text aufgeführt, muss eine Modifikation der siRNA am 3'-Ende erfolgen, um eine Toleranz durch den *RISC* zu gewährleisten. Dies bedeutet allerdings, dass diese Modifikation ca. 20 Syntheszyklen während der Festphasensynthese standhalten muss. Eine Disulfidspaltung von 20 % pro Zyklus führt letztendlich zu einem theoretisch maximalen Erhalt von 1 % Disulfid nach 20 Syntheszyklen. Selbst bei einer Optimierung der Reaktionsbedingungen auf 10 % Disulfidspaltung pro Zyklus würden insgesamt nur 12 % des Disulfids intakt bleiben.

Um eine Verwendung des 2'-Fluoro-Disulfanyloktadiinyl-Uridinphosphoramidits **8** dennoch zu ermöglichen, wurde die Adapter-Strategie von Huang^[137] angewendet, deren Prinzip in Abbildung 4.4 dargestellt ist. Anstelle einer direkten Modifikation des *sense*-Strangs und anschließender Hybridisierung an den *antisense*-Strang zur Bildung der siRNA wird bei dieser Strategie ein modifiziertes Oligonukleotid (schwarz) zusammen mit dem *antisense*-Strang (blau) an einen verlängerten *sense*-Strang (rot) hybridisiert. Dieses Adapter-Konstrukt wird anschließend durch das *Dicer*-Enzym zur entsprechenden siRNA prozessiert. Diese Strategie gestattete den Einbau der Modifikation am 5'-Ende und stellte damit eine vielversprechende Alternative für den Einsatz des Disulfanyloktadiinyl-Amidits **8** dar. Die Methode hat zudem gegenüber der direkten Modifikation von siRNA zwei Vorteile. Erstens lässt sich das modifizierte Oligonukleotid an jede beliebige siRNA hybridisieren, indem man deren *sense*-Strang um die komplementäre Sequenz des modifizierten Oligonukleotids verlängert. Dies reduziert die Synthese modifizierter Oligonukleotide auf eine universelle Sequenz. Zweitens ist das modifizierte Oligonukleotid kein Bestandteil der eigentlichen siRNA und kann deshalb auch aus DNA-Nukleotiden synthetisiert werden. Dies führt zu einer weitaus einfacheren und kostengünstigeren Synthese. Huang postuliert darüber hinaus, dass die intrazelluläre Verfügbarkeit der siRNA durch dieses Konstrukt erhöht wird, da eine Prozessierung durch den *Dicer* die Abtrennung der siRNA und dem modifizierten Oligonukleotid bewirkt.^[137] Allerdings involviert diese Strategie mit dem *Dicer*-Enzym ein weiteres Enzym, welches die Modifikation des Oligonukleotids tolerieren muss.



Abbildung 4.4: Aufbau und Wirkprinzip des Adapter-Konstrukts. Ein modifiziertes DNA-Oligonukleotid (schwarz) wird zusammen mit dem *antisense*-Strang (rot) an einen verlängerten *sense*-Strang (blau) hybridisiert. Dieses Adapter-Konstrukt wird innerhalb der Zelle durch das *Dicer*-Enzym zur entsprechenden siRNA prozessiert.

Um den Einfluss des Disulfids bestimmen zu können, wurde ein DNA-Oligonukleotid unter Verwendung des 2'-Fluoro-Disulfanyloktadiinyl-Uridinphosphoramidits **8** und ein weiteres DNA-Oligonukleotid unter Verwendung des 2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridinphosphoramidits **7** synthetisiert. Die synthetisierten Adapter-Oligonukleotide ODN14 und ODN15 sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. Die GC-reiche Sequenz der Adapter-Oligonukleotide und die Länge von 15 Nukleotiden resultieren in einem Schmelzpunkt des DNA/RNA-Hybrids weit über 37 °C und gewährleisten dadurch die Stabilität des Adapter-Konstruktes *in vitro*.

Bezeichnung	Strang	Sequenz 5' → 3'
Adapter1	ODN14	<u>X</u> CG-TCG-TCG-TCG-TCT
Adapter2	ODN15	<u>Y</u> CG-TCG-TCG-TCG-TCT

Tabelle 4.2: Synthetisierte DNA Adapter-Oligonukleotide mit den zugehörigen Sequenzen. X = 2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridin, Y = 2'-Fluoro-Disulfanyloktadiinyl-Uridin.

4.1.4 Synthese funktioneller Azide

Bisher wurde versucht, die Wirksamkeit der aufgenommenen siRNA hinsichtlich der Stabilität und der intrazellulären Verfügbarkeit zu optimieren. Ebenfalls entscheidend für die Wirksamkeit der siRNA ist deren effektive Aufnahme in die Zellen. Prinzipiell lässt sich die Aufnahme durch Variation der AEA-Modifikation beeinflussen. Zu diesem Zweck wurden die in Abbildung 4.5 abgebildeten Anandamid-Derivate Arachidonoyl-ethylen-glykol-Azid **21** (AEG-Azid) und Retroanandamid-Azid **22** (RAEA-Azid) synthetisiert. Dieses Kapitel beschreibt die Aufnahme-Eigenschaften beider AEA-Analoga und die zugehörigen Synthesen. Abschließend wird die Synthese des Cholesterol-Azids **23** (Chol-Azid) vorgestellt. Mit Hilfe dieses Azids **23** sollte die Effektivität der AEA-siRNA direkt in Relation zu Cholesterol-siRNA gesetzt werden, welches das derzeit erfolgreichste siRNA Liganden-Konjugat darstellt.

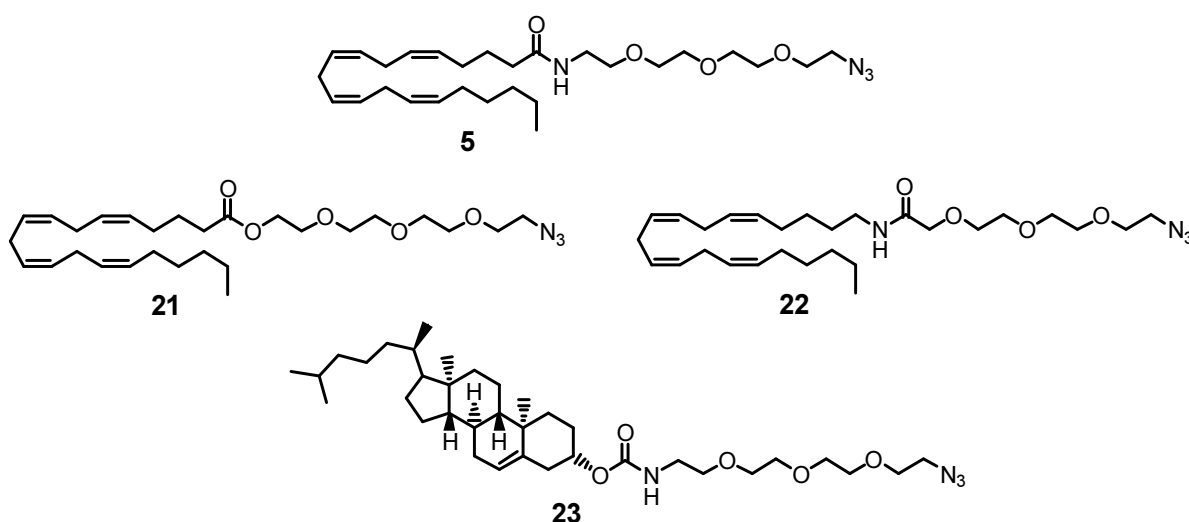
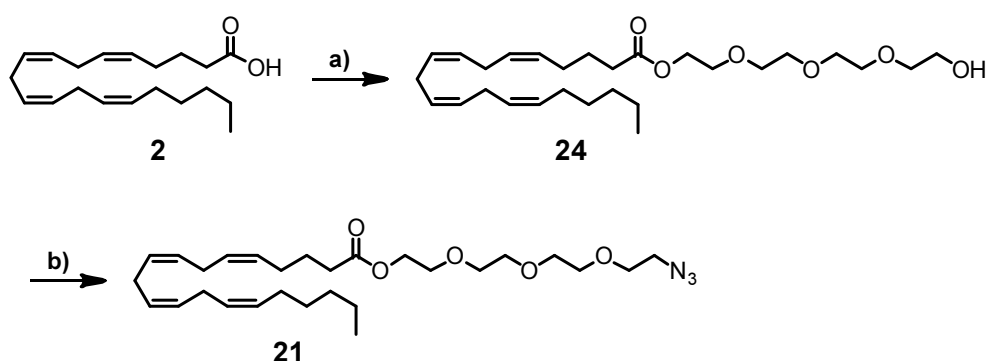


Abbildung 4.5: Azidofunktionalisierte Anandamid-Derivate Arachidonoyl-ethylen-glykol-Azid **21** (AEG-Azid) und Retroanandamid-Azid **22** (RAEA-Azid) sowie das Cholesterol-Azid **23** (Chol-Azid). Zum Vergleich der Strukturen ist Anandamid-Azid **5** (AEA-Azid) ebenfalls aufgeführt. Durch den identischen Azidolinker bei allen Aziden sollte eine konsistente Modifikation der siRNA gewährleistet werden.

In Kapitel 1.4 der Einleitung wurden die möglichen Aufnahme-Mechanismen von AEA in die Zelle sowie der intrazelluläre Transport und der enzymatische Abbau detailliert vorgestellt. Die Hydrolyse von AEA durch die Fettsäureamid-Hydrolase FAAH hält dabei den Konzentrationsgradienten zwischen extra- und intrazellulärem Bereich aufrecht und verstärkt dadurch die weitere Aufnahme von AEA in die Zelle.^[9f, 180, 184] Die Hydrolyse der AEA-Modifikation der siRNA sollte demnach deren Aufnahme ebenfalls verstärken. Allerdings konnten bereits die AEA-Aufnahmesonden SKM4-45-1 von *Hillard*^[202b] und Biotin-AEA von *Maccarrone*^[203-204] durch FAAH nicht hydrolysiert werden. Dies spricht für eine geringe Toleranz von FAAH gegenüber der Modifikation von AEA an der polaren Ethanolamid-Einheit und verringert damit die Chancen auf eine Hydrolyse der AEA-Modifikation der siRNA. Um die Hydrolyse dennoch zu ermöglichen und damit die Aufnahme der siRNA durch einen kontinuierlichen Konzentrationsgradienten zu fördern, wurde das hydrolyselabile Arachidonoyl-ethylen-glykol-Azid **21** (AEG-Azid) synthetisiert.

Arachidonylethylenglykol (AEG) konnte durch *Muller* in CHO-Zellen in einem kompetitiven Bindungsassay mit dem Antagonisten CP-55,940 eine vergleichbare Affinität gegenüber den Cannabinoidrezeptoren wie AEA nachgewiesen werden.^[225] Allerdings wurde AEG dabei wesentlich schneller hydrolysiert als AEA. So konnte *Muller* zeigen, dass AEG im Gehirnhomogenisat einer Ratte bereits nach 30 Minuten vollständig hydrolysiert wurde.^[225] Dies lässt sich dadurch erklären, dass AEG zusätzlich zu FAAH durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert werden kann. *Makriyannis* konnte darüber hinaus in einem kompetitiven Aufnahmeassay zeigen, dass AEG die Aufnahme von [³H]AEA besser inhibieren konnte als AEA.^[179d] Dies ließe sich ebenfalls durch einen verstärkten Konzentrationsgradienten von AEG aufgrund schnellerer Hydrolyse erklären. Überträgt man diese Beobachtungen auf die Aufnahme von modifizierter siRNA, so sollte AEG-modifizierte siRNA besser durch die Zellen aufgenommen werden als AEA-modifizierte siRNA.

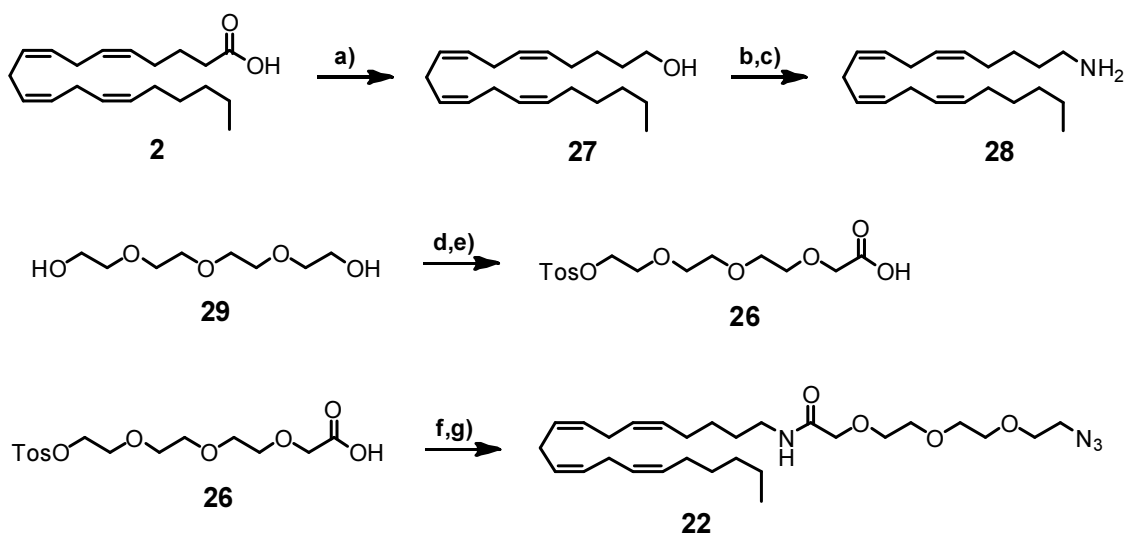
Die Synthese des AEG-Azids **21** erfolgte über zwei Stufen ausgehend von Arachidonsäure **2** durch Bildung des Arachidonoyltetraethylenglykols **24** und anschließender Funktionalisierung mittels Natriumazid. Durch die Verwendung von Tetraethylenglykol im zehnfachen Überschuss zur Bildung des Arachidonylesters **24** wurde gewährleistet, dass sich ausschließlich das monofunktionalisierte Produkt bildete. Die Funktionalisierung zum AEG-Azid **21** wurde basierend auf einer Arbeit von *Iyengar* durch eine Appel-ähnliche Reaktion mit Triphenylphosphin und Natriumazid durchgeführt.^[226] Der Vorteil dieser Reaktion liegt darin, dass die Bildung der Abgangsgruppe und die anschließende nukleophile Substitution in einer Stufe erfolgen. Die vollständige Synthese von AEG-Azids **21** ist in Schema 4.4 aufgeführt.



Schema 4.4: Synthese von Arachidonoyltetraethylglykol-Azid **21** ausgehend von Arachidonsäure **5**. a) Tetraethylenglykol, PyBOP, DIPEA, DMF, 3 h, RT, 85 %, b) NaN₃, PPh₃, DMF/CCl₄, 2 h, 60 °C, 99 %.

Erstaunlicherweise wurde Biotin-AEA vergleichbar effektiv wie AEA durch die Zellen aufgenommen, obwohl es durch FAAH nicht hydrolysiert wurde. *Maccarrone* wies daher die dominante Rolle der Hydrolyse von AEA während der Aufnahme zurück.^[203-204] *Maccarrone* konnte allerdings die Ursache der Hydrolyse-Resistenz von Biotin-AEA gegenüber FAAH nicht eindeutig bestimmen. Die Modifikation der polaren Ethanolamid-Einheit könnte einerseits dazu führen, dass Biotin-AEA nicht länger von FAAH erkannt wird. Andererseits könnte die Modifikation zu einer permanenten Bindung an FAAH führen, indem nicht die Erkennung sondern die katalytische Aktivität unterdrückt wird. Im Fall der AEA-siRNA hätte dies die Beeinträchtigung der Verfügbarkeit der siRNA zur Folge und könnte damit deren Aktivität herabsetzen. Um eine bestmögliche Verfügbarkeit der aufgenommenen siRNA zu gewährleisten, wurde daher das Retroanandamid-Azid **22** (RAEA-Azid) synthetisiert.

Retroanandamid (RAEA) konnte durch *Makriyannis* in synaptischen Membranen des Vorderhirns in einem kompetitiven Bindungsassay mit dem Antagonisten CP-55,940 eine vergleichbare Affinität gegenüber den Cannabinoidrezeptoren wie AEA nachgewiesen werden.^[196] *Makriyannis* konnte darüber hinaus zeigen, dass die Anwesenheit des selektiven FAAH-Inhibitors Phenylmethansulfonylfluorid die Aufnahme von AEA um zwei Größenordnungen verschlechterte. Die Aufnahme von RAEA hingegen wurde durch den FAAH-Inhibitor nicht beeinflusst.^[196] *Makriyannis* folgerte daraus, dass RAEA kein Substrat für FAAH darstellt. *Järvinen* konnte zeigen, dass sich RAEA auch gegenüber weiteren Hydrolasen als äußerst hydrolysestabil im Vergleich zu AEA erweist. Nach 90 Minuten im Gehirnhomogenisat einer Ratte konnte bei RAEA keine Hydrolyse nachgewiesen werden, wohingegen AEA zu diesem Zeitpunkt nahezu vollständig hydrolysiert vorlag.^[227] Überträgt man diese Beobachtungen auf die Aufnahme von modifizierter siRNA, so sollte RAEA-siRNA intrazellulär eine bessere Verfügbarkeit als AEA-siRNA aufweisen. Da RAEA intrazellulär definitiv nicht hydrolysiert werden kann, sollte sich durch den Vergleich zwischen RAEA-siRNA und AEG-siRNA der Einfluss der Hydrolyse eindeutig bestimmen lassen.

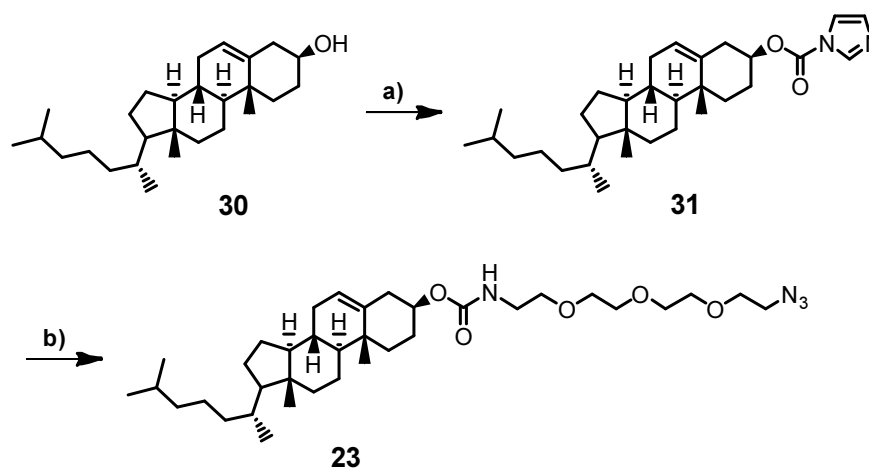


Schema 4.5: Synthese von Retroanandamid-Azid **22** ausgehend von Arachidonsäure **2**. a) LiAlH₄, THF, 1 h, 0 °C, 96 %, b) NaN₃, PPh₃, DMF/CCl₄, 3

Für die Synthese des RAEA-Azids **22** wurde Arachidonsäure **2** zu Arachidonylamin **25** umgesetzt und anschließend durch Amidbildung mit der Azidosäure **26** verknüpft. Die zugehörige Synthese ist in Schema 4.5 aufgeführt. Zu Beginn der Synthese wurde Arachidonsäure **2** mittels Lithiumaluminiumhydrid zum korrespondierenden Arachidonylalkohol **27** reduziert. Arachidonylalkohol **27** wurde ebenfalls basierend auf der Arbeit von *Iyengar* durch eine Appel-ähnliche Reaktion mit Triphenylphosphin und Natriumazid zum korrespondierenden Arachidonylazid umgesetzt^[226] und anschließend zu Arachidonylamin **28** reduziert. Laut *Iyengar* ließe sich das Azid durch Verwendung eines weiteren Äquivalents Triphenylphosphin direkt zum Amin reduzieren.^[226] Aufgrund der optimierten Reaktionsbedingungen der Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid im vorgegangenen Schritt, wurde jedoch erneut diese Methode gewählt, um das Arachidonylazid zum entsprechenden Arachidonylamin **28** zu reduzieren. Die Synthese der Azidosäure erfolgte über drei Schritte ausgehend von Tetraethylen glykol **29**. Nach Tosylierung der ersten Hydroxygruppe wurde die zweite Hydroxygruppe durch Jones-Oxidation^[228] zur korrespondierenden Säure oxidiert. Nukleophile Substitution der Tosylgruppe durch

Natriumazid lieferte schließlich die gewünschte Azidosäure **26**. Im finalen Schritt wurden die Azidosäure **26** und das zuvor synthetisierte Arachidonylamin **25** zum RAEA-Azid **22** gekuppelt.

Wie in Kap. 1.3 der Einleitung vorgestellt, konnte *Vornlocher* mit Hilfe von Cholesterol-modifizierter siRNA erstmals *in vivo* ein endogenes Gen regulieren.^[107] Dieses siRNA Liganden-Konjugat stellt derzeit das wohl erfolgreichste Liganden-Konjugat für die Rezeptor-vermittelte Genregulation mittels modifizierter siRNA dar. Um die Effektivität der AEA-modifizierten siRNA direkt in Relation zu Cholesterol-modifizierter siRNA zu setzen, wurde ein entsprechendes Cholesterol-Azid **23** (Chol-Azid) synthetisiert. Die vollständige Synthese ist in Schema 4.6 aufgeführt. Die Funktionalisierung des Cholesterols **30** erfolgte dabei analog zu *Vornlocher* unter Ausbildung eines Carbamats. Der entsprechende Azidolinker **6** wurde aus der Synthese des AEA-Azids **5** übernommen. Das Chol-Azid **23** verbindet somit die strukturellen Eigenschaften beider Systeme und ermöglicht dadurch einen akkuraten Vergleich.



Schema 4.6: Synthese von Cholesterolazid **23** ausgehend von Cholesterol **30**. a) CDI, DCM, 24 h, RT, 98 %, b) Azido-3,6,9-trioxaundekan-1-amin (**6**), CHCl₃, 4 d, 50 °C, 58 %.

Die Synthese des Cholesterolazids **23** erfolgte über zwei Stufen ausgehend von Cholesterol **30**. Im ersten Schritt wurde die Hydroxygruppe des Cholesterols **30** mittels Carbonyldiimidazol (CDI) aktiviert und das aktivierte Cholesterolderivat **31** anschließend durch Reaktion mit Azidoamin **6** zum gewünschten Azidocholesterylcarbamate **23** umgesetzt.

4.1.5 Modifizierte Luciferase-siRNA

In Tabelle 4.3 sind sämtliche Luciferase-siRNAs aufgeführt, welche im Rahmen der RNA-Interferenz Studien im folgenden Kapitel 4.3 verwendet wurden. Die Funktionalisierung der einzelsträngigen RNA mit den entsprechenden Liganden erfolgte durch Click-Modifikation unter Verwendung der Azide Anandamid-Azid **5** (AEA-Azid), Arachidonoyl-ethylenglykol-Azid **21** (AEG-Azid), Retroanandamid-Azid **22** (RAEA-Azid) und Cholesterol-Azid **23** (Chol-Azid). Nach erfolgreicher Click-Modifikation wurden die aufgelisteten siRNA-Duplexe durch Hybridisierung der entsprechenden *sense*- und *antisense*-Stänge konstruiert. Die ebenfalls in Tabelle 4.3 aufgeführte *nonsense*-RNA dient zur Kontrolle der Spezifität der RNA-Interferenz. Ihre Funktion wird im Rahmen der Kontrollexperimente in Kapitel 4.3.1 eingehender vorgestellt.

Bezeichnung	Strang	Sequenz (<i>sense</i> / <i>antisense</i>)
<i>nonsense</i> -RNA	ORN09 ORN10	5' - UUC-UCC-GAA-CGU-GUC-ACG-UTT 3' - TTAAG-AGG-CUU-GCA-CAG-UGC-A
LUC-siRNA	ORN03 ORN11	5' - GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CTT 3' - TTCCG-GAA-AGU-GAU-GAG-GAU-G
AEA -LUC-siRNA1	ORN01+5 ORN11	5' - GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CTX(+X) 3' - TTCCG-GAA-AGU-GAU-GAG-GAU-G
AEA -LUC-siRNA2	ORN06+5 ORN11	5' - GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CX(+X)T 3' - TTCCG-GAA-AGU-GAU-GAG-GAU-G
AEA -LUC-siRNA3	ORN07+5 ORN11	5' - GGC-CUU- <u>UCA</u> - <u>CUA</u> -CUC-CUA-CX(+X)T 3' - TTCCG-GAA-AGU-GAU-GAG-GAU-G
AEA -LUC-siRNA4	ORN08+5 ORN11	5' - GGC- <u>CUU</u> - <u>UCA</u> - <u>CUA</u> -CUC-CUA-CX(+X)T 3' - TTCCG-GAA-AGU-GAU-GAG-GAU-G
AEA -LUC-siRNA5	ORN07+5 ORN04	5' - GGC-CUU- <u>UCA</u> - <u>CUA</u> -CUC-CUA-CX(+X)T 3' - <u>UCCG</u> -GAA-AGU-GAU-GAG-GAU-G
AEA -LUC-siRNA6	ORN07+5 ORN05+5	5' - GGC-CUU- <u>UCA</u> - <u>CUA</u> -CUC-CUA-CX(+X)T 3' - TX(+X) <u>CCG</u> -GAA-AGU-GAU-GAG-GAU-G
Chol -LUC-siRNA	ORN07+23 ORN11	5' - GGC-CUU- <u>UCA</u> - <u>CUA</u> -CUC-CUA-CX(+X)T 3' - TTCCG-GAA-AGU-GAU-GAG-GAU-G
AEG -LUC-siRNA	ORN07+21 ORN11	5' - GGC-CUU- <u>UCA</u> - <u>CUA</u> -CUC-CUA-CX(+X)T 3' - TTCCG-GAA-AGU-GAU-GAG-GAU-G
RAEA -LUC-siRNA	ORN07+22 ORN11	5' - GGC-CUU- <u>UCA</u> - <u>CUA</u> -CUC-CUA-CX(+X)T 3' - TT-CCG-GAA-AGU-GAU-GAG-GAU-G
AEA -LUC-AdRNA1	ORN12 ORN11 ODN14+5	5' - GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CUU-AGA-CGA-CGA-CGA 3' - TTCCG-GAA-AGU-GAU-GAG-GAU-G -TCT-GCT-GCT-GCT-GCY(+X)
AEA -LUC-AdRNA2	ORN12 ORN11 ODN15+5	5' - GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CUU-AGA-CGA-CGA-CGA 3' - TTCCG-GAA-AGU-GAU-GAG-GAU-G -TCT-GCT-GCT-GCT-GCY(+X)

Tabelle 4.3: Modifizierte Luciferase-siRNAs mit den zugehörigen Sequenzen. Die Liganden-Modifikation der siRNA erfolgte durch Cycoaddition der entsprechenden Azide an das Alkinnukleosid **X** des jeweiligen Einzelstrangs. N = Desoxyribonukleosid, *N* = Ribonukleosid, **N** = 2'-Fluoronukleosid, **X** = 2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridin. **AEA** = Anandamid, **AEG** = Arachidonoyl-ethylenglykol, **RAEA** = Retro-anandamid, **Chol** = Cholesterol.

4.2 Duales Luciferase Reportersystem

Die Quantifizierung der RNA-Interferenz erfolgte durch ein duales Luciferase Reportersystem. Zu diesem Zweck wurden die adhärenenten Mastzellen RBL-2H3 mit dem Plasmidvektor psiCHECK™-2 transfiziert. Das vollständige Experiment ist in Abbildung 4.6 dargestellt. Luciferasen katalysieren die Oxidation von Luciferinen zu Dioxetanen, welche anschließend unter Emission von Licht zerfallen. Die Intensität dieser Emission ist direkt proportional zur Anzahl der Luciferase-Enzyme und ermöglicht dadurch eine einfache und genaue Methode der Quantifizierung durch Detektion der Biolumineszenz. Der Plasmidvektor psiCHECK™-2 trägt die genetische Information der *Firefly*-Luciferase und der *Renilla*-Luciferase. In sämtlichen hier durchgeführten Studien diente die *Renilla*-Luciferase als Reporterenzym der RNA-Interferenz. Die *Firefly*-Luciferase wurde als interner Standard zur Normalisierung der *Renilla*-Luciferase verwendet. Dazu wurde die Lumineszenz der *Renilla*-Luciferase stets in Relation zur Lumineszenz *Firefly*-Luciferase gesetzt. Diese Normalisierung der absoluten Lumineszenz war notwendig, um dadurch sämtliche Schwankungen des Experiments auszugleichen. Die Schwankungen werden u.a. hervorgerufen durch Abweichungen in der Anzahl der Zellen sowie durch unterschiedliche Plasmid-Expressionsraten. Die Unterscheidung der beiden Luciferasen war durch ihre unterschiedliche Substratspezifität möglich (siehe Abbildung 4.7). Die *Firefly*-Luciferase katalysiert eine ATP-abhängige oxidative Decarboxylierung von Luciferin unter Freisetzung von Licht der Wellenlänge 560 nm. Durch die *Renilla*-Luciferase hingegen wird die ATP-unabhängige oxidative Decarboxylierung von Coelenterazin katalysiert, wodurch Licht der Wellenlänge 482 nm emittiert wird. Die Regulation der *Renilla*-Luciferase erfolgte unter Zugabe der in Kapitel 4.1.3 vorgestellten LUC-siRNA, wodurch die mRNA der *Renilla*-Luciferase sequenzspezifisch durch den aktivierten RISC geschnitten wurde.

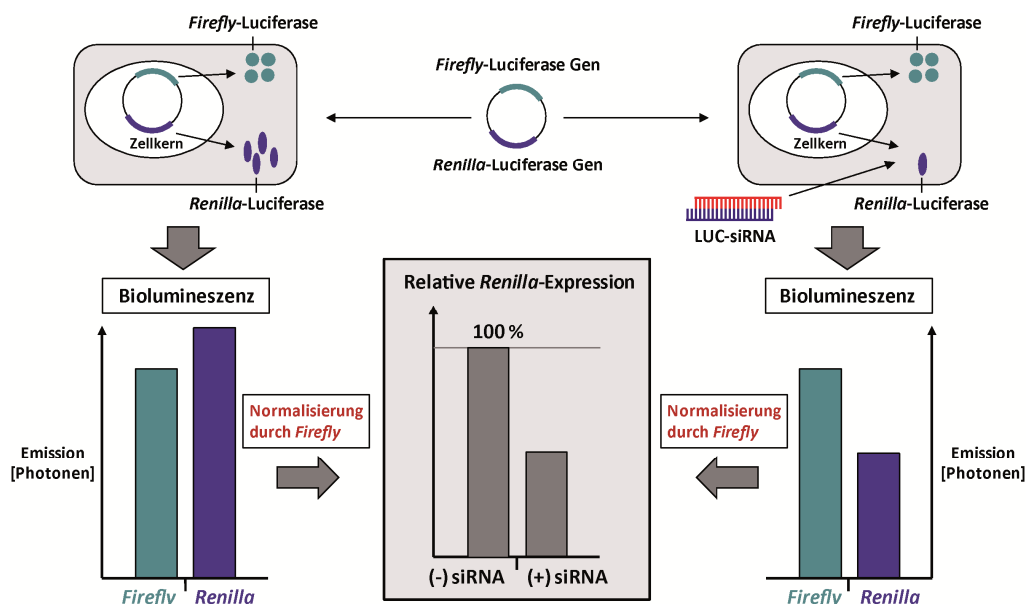


Abbildung 4.6: Quantifizierung der RNA-Interferenz unter Verwendung des dualen Luciferase Reportersystems. Die Zellen wurden mit dem Plasmidvektor psiCHECK™-2 transfiziert, welcher die genetische Information einer *Renilla*- und einer *Firefly*-Luciferase trägt. Die Quantifizierung der Luciferase-Expressionslevel erfolgte durch Detektion der Biolumineszenz nach Zugabe von Luciferin bzw. Coelenterazin. Die Biolumineszenz der *Firefly*-Luciferase diente dabei zur internen Normierung der Biolumineszenz der *Renilla*-Luciferase. Die RNA-Interferenz ließ sich anhand der reduzierten Biolumineszenz der *Renilla*-Luciferase nach zusätzlicher Transfektion der LUC-siRNA quantifizieren.

Für die RNA-Interferenz Studien wurden die adhärenenten Mastellen RBL-2H3 in 96-*well* Platten inkubiert und anschließend mit dem Plasmidvektor psiCHECK™-2 transfiziert. Die Transfektion des Plasmidvektors erfolgte unter Verwendung des kommerziellen Transfektionsreagenzes jetPRIME. Nach einem zeitlichen Versatz von 4 h wurde die LUC-siRNA zugegeben und nach weiteren 48 h Inkubation die Effektivität der Regulation durch Detektion der Biolumineszenz quantifiziert.

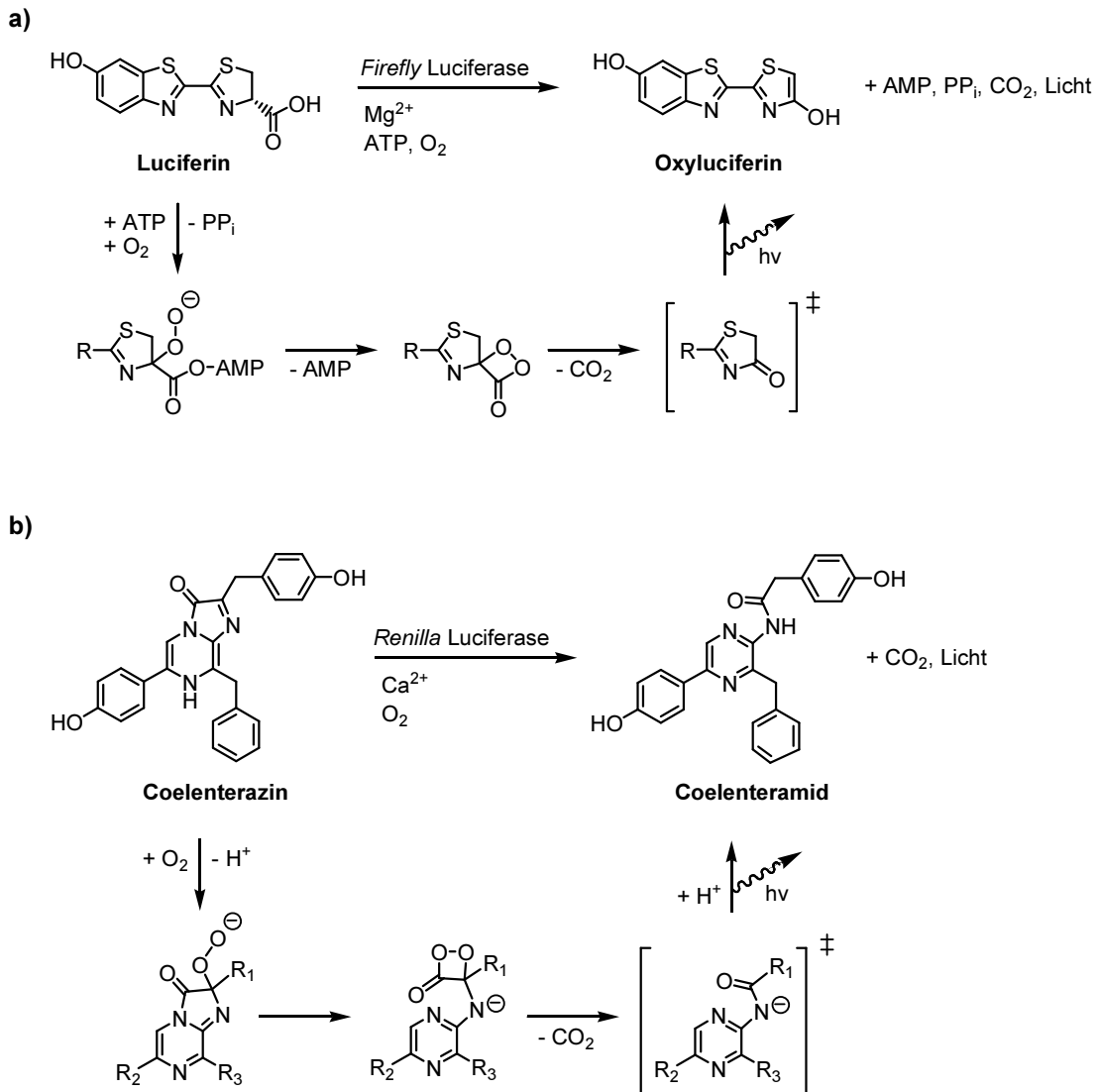


Abbildung 4.7: Luciferase-katalysierte Oxidation der Luciferine Luciferin und Coelenterazin zu den korrespondierenden Dioxetanen, welche anschließend unter Emission von Licht zerfallen. **a)** ATP-abhängige Oxidation und Decarboxylierung von Luciferin durch die *Firefly*-Luciferase. **b)** ATP-unabhängige Oxidation und Decarboxylierung von Coelenterazin durch die *Renilla*-Luciferase

4.3 Luciferase-Assays I

Das folgende Kapitel beschreibt zu Beginn die notwendigen Kontrollexperimente der RNA-Interferenz Studien. Anschließend werden die Ergebnisse der *Renilla*-Luciferase Regulation durch die synthetisierte AEA-siRNA vorgestellt. Zur Referenzierung der Effektivität der AEA-siRNA diene dabei die ebenfalls synthetisierte Cholesterol-siRNA. Im Anschluss daran wird der Einfluss der Stabilisierung der siRNA auf deren Aktivität diskutiert. Des Weiteren wird die Regulation der *Renilla*-Luciferase mit Hilfe des Adapter-Konstrukts und in diesem Zusammenhang der Einfluss des Disulfids vorgestellt. Das Kapitel schließt mit der Regulation der *Renilla*-Luciferase unter Verwendung von siRNA, welche mit den Anandamid-Derivaten Arachidonylethylenglykol (AEG) und Retroanandamid (RAEA) modifiziert wurde.

4.3.1 Kontrollexperimente

Vor den eigentlichen Regulations-Experimenten sollten diverse Kontrollexperimente eine akkurate Interpretation der Ergebnisse gewährleisten. Bei diesen Kontrollexperimenten wurde die siRNA, wie schon der Plasmidvektor psiCHECK™-2, mit Hilfe des Transfektionsreagenzes jetPRIME transfiziert. Dies sollte die Aufnahme der siRNA in die Zellen sicherstellen, um dadurch deren regulatorische Aktivität verifizieren zu können. In einem ersten Kontrollexperiment wurden die Zellen mit unmodifizierter LUC-siRNA transfiziert. Durch diese Positivkontrolle sollte gezeigt werden, dass die verwendete LUC-siRNA tatsächlich zur Regulation der *Renilla*-Luciferase fähig war. Als zweite Positivkontrolle wurden die Zellen mit AEA-LUC-siRNA1 transfiziert, um so den Einfluss der AEA-Modifikation auf die Effektivität der siRNA zu analysieren. Ein weiteres essentielles Kontrollexperiment war die Verwendung von sogenannter *nonsense*-RNA. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass die beobachtete Regulation der *Renilla*-Luciferase tatsächlich sequenzspezifisch erfolgte. Die Sequenz der *nonsense*-RNA wird dabei so gewählt, dass diese an keiner Position der adressierten mRNA und darüber hinaus an keiner Position des gesamten Genoms vollständig übereinstimmt.

Abbildung 4.8 zeigt die Resultate der Kontrollexperimente. Die Transfektion der *nonsense*-RNA hatte dabei keinerlei Auswirkung auf die relative Expression der *Renilla*-Luciferase. Die Transfektion der LUC-siRNA ergab hingegen eine konzentrationsabhängige Regulation der *Renilla*-Luciferase. Damit kann die beobachtete Reduktion der *Renilla*-Luciferase Expression eindeutig der sequenzspezifischen RNA-Interferenz durch LUC-siRNA zugeordnet werden. Die Transfektion von AEA-LUC-siRNA1 führte zu einer vergleichbaren Regulation wie unmodifizierte LUC-siRNA. Dadurch lässt sich schließen, dass die Modifikation der siRNA an der 3'-Position des *sense*-Strangs wie geplant deren Aktivität nicht beeinträchtigt.

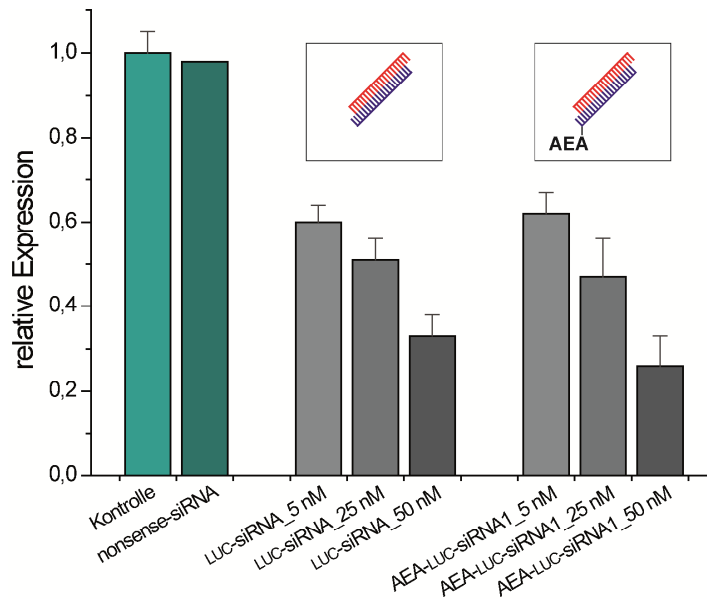


Abbildung 4.8: Kontrollexperimente der RNA-Interferenz Studien. Die erfolgreiche Transfektion der siRNA wurde durch das Transfektionsreagenz jetPRIME gewährleistet. Negativkontrolle: *nonsense*-RNA führt zu keiner Regulation. Positivkontrolle1: Konzentrationsabhängige Regulation durch LUC-siRNA. Positivkontrolle2: Konzentrationsabhängige Regulation durch modifizierte AEA-LUC-siRNA. AEA = Anandamid.

Zusammenfassend konnten die Kontrollexperimente zeigen, dass die Expression der *Renilla*-Luciferase selektiv und konzentrationsabhängig durch die LUC-siRNA reguliert wurde. Die zusätzliche Modifikation der siRNA mit AEA hatte dabei keinen Einfluss auf deren Aktivität.

4.3.2 Regulation mit Anandamid-modifizierter siRNA

Nach Abschluss der Kontrollexperimente wurde untersucht, ob die Zugabe von AEA-LUC-siRNA3 ohne Transfektionsreagenz ebenfalls zur Regulation der *Renilla*-Luciferase führen würde. Zur Referenzierung der Effektivität der AEA-LUC-siRNA3 wurde in einem weiteren Experiment Chol-LUC-siRNA zu den Zellen gegeben. Neben den modifizierten siRNAs wurden ebenfalls die unmodifizierte LUC-siRNA ohne Transfektionsreagenz zu den Zellen gegeben. Dies sollte sicherzustellen, dass die Aufnahme der AEA- bzw. Chol-siRNA tatsächlich auf die jeweiligen Liganden zurückzuführen war. Die Resultate des Experiments sind in Abbildung 4.9 aufgeführt.

Die Zugabe von unmodifizierter LUC-siRNA ohne Transfektionsreagenz hatte keinerlei Auswirkung auf die relative Expression der *Renilla*-Luciferase. Dies untermauert die Ergebnisse der Aufnahmestudien in Kapitel 2, dass unmodifizierte Oligonukleotide durch die Mastzellen RBL-2H3 nicht aufgenommen werden und die unmodifizierte siRNA daher keinerlei Regulation bewirken konnte. Die Zugabe der AEA-siRNA zu den Zellen bewirkte hingegen eine konzentrationsabhängige Regulation der relativen Expression der *Renilla*-Luciferase. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass AEA-modifizierte siRNA von Cannabinoidrezeptor-positiven Immunzellen aufgenommen wird und darüber hinaus die Verfügbarkeit der siRNA weiterhin gegeben ist! Ein Vergleich der regulatorischen Fähigkeit von AEA-siRNA und Chol-siRNA zeigt, dass AEA-siRNA in diesem Experiment die höhere Effektivität aufweisen konnte. Dies trifft für den gesamten Konzentrationsbereich im Rahmen der hier durchgeführten Studie zu.

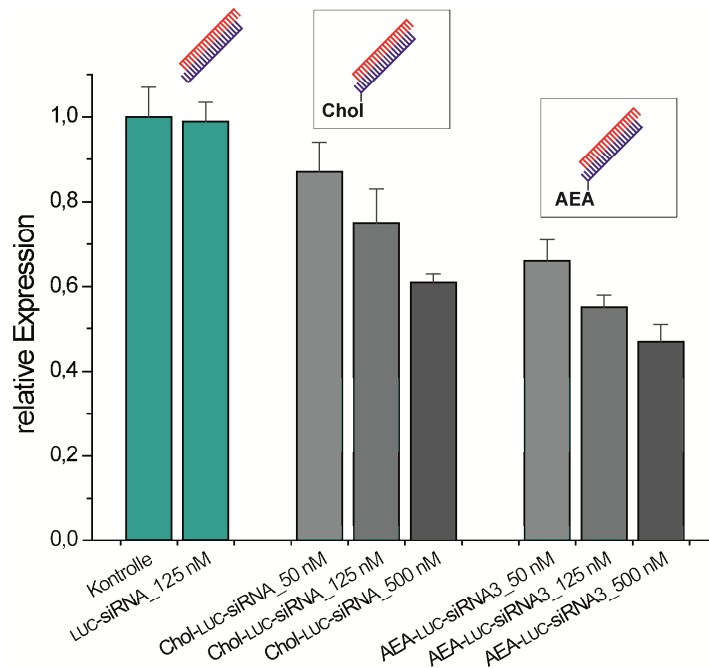


Abbildung 4.9: Regulation der *Renilla*-Luciferase durch AEA-siRNA und Chol-siRNA in Abwesenheit eines Transfektionsreagenzes. AEA = Anandamid, Chol = Cholesterol.

In einem weiteren Experiment wurde die RNA-Interferenz der AEA-vermittelten siRNA-Aufnahme mit der jetPRIME-Transfektion der siRNA verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass die Effektivität der LUC-siRNA durch die Transfektion mit jetPRIME wesentlich höher war als durch die AEA-vermittelte Aufnahme. So reduzierte die Transfektion mit jetPRIME bereits bei einer siRNA-Konzentration von 50 nM die relative Expression der *Renilla*-Luciferase um ca. 70 % wohingegen die AEA-vermittelte Aufnahme der siRNA bei dieser Konzentration die Expression lediglich um ca. 35 % reduzierte. Selbst die zehnfach höhere Konzentration von 500 nM konnte die Effektivität der jetPRIME-transfizierten siRNA nicht erreichen und führte zu einer Reduktion der Expression auf ca. 50 %. Zur Verdeutlichung sind in Abbildung 4.10 die relativen Regulationen in einem linearen Diagramm zusammengefasst.

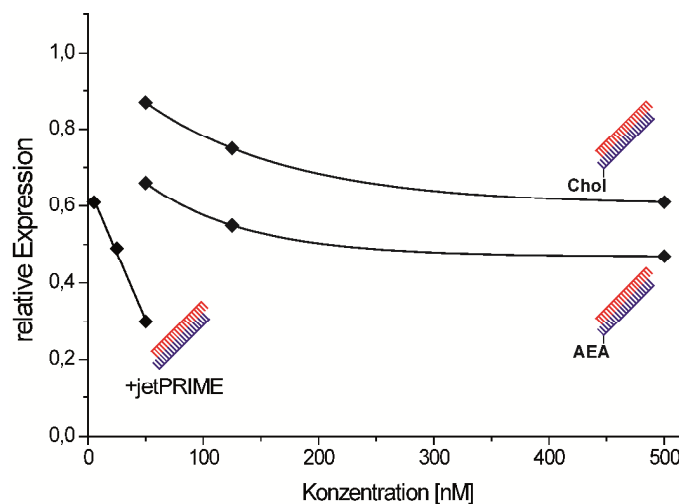


Abbildung 4.10: Vergleich der RNA-Interferenz bei Transfektion der siRNA mit jetPRIME gegenüber AEA- bzw. Chol-vermittelter Aufnahme. Die Konzentration wurde zur Veranschaulichung linear entlang der x-Achse aufgetragen. AEA = Anandamid, Chol = Cholesterol.

Neben der höheren Effektivität der RNA-Interferenz bei Transfektion der siRNA mit jetPRIME wird in Abbildung 4.10 ein weiterer Faktor deutlich: Während die Regulation bei jetPRIME-Transfektion linear mit der siRNA-Konzentration korreliert, scheint sich die Regulation bei AEA- und Chol-vermittelter Aufnahme ab einer gewissen siRNA-Konzentration zu sättigen. Dieser Effekt ließe sich durch eine begrenzte Aufnahmekapazität der Transportsysteme interpretieren. Die maximale Aufnahmefähigkeit der Zellen wäre demnach durch die begrenzte Anzahl an Rezeptoren bzw. Transportsystemen an der Zelloberfläche definiert. Die notwendige Regeneration dieser Transportsysteme zur erneuten Aufnahme könnte in Verbindung mit der temporären Wirkung der RNA-Interferenz und der geringen Stabilität der siRNA zu einer Sättigung der Effektivität führen. Die maximale Aufnahme der Liganden in die Zellen wird darüber hinaus durch einen Konzentrationsgradienten zwischen extra- und intrazellulärem Bereich begrenzt. Die Sättigung der Effektivität könnte daher auch auf den maximalen Gradienten der Liganden-modifizierten siRNA zurückzuführen sein. Da die hier verwendete Konzentration von 500 nM die nahezu maximale Regulationsfähigkeit der AEA- und Chol-siRNA darstellte, wurde im nächsten Schritt versucht, diese Effektivität durch Modifikation mit 2'-Fluoro-Nukleosiden weiter zu erhöhen.

4.3.3 Einfluss der Stabilität auf die Effektivität der siRNA

Wahlestedt hatte in einer Studie die direkte Auswirkung erhöhter Modifikation von siRNA auf deren Stabilität und Aktivität eingehend untersucht und konnte einen generell gegenläufigen Trend zwischen Stabilität und Aktivität feststellen.^[70] Er kam zu dem Schluss, dass bei einer geringfügigen Modifikation der siRNA die erhöhte Stabilität über die reduzierte Aktivität dominiert und dies insgesamt die Effektivität der siRNA steigert. Bei mehrfacher Modifikation der siRNA dominiert allerdings die reduzierte Aktivität über die erhöhte Stabilität und verringert damit insgesamt die Effektivität der siRNA. Diese Beobachtungen decken sich mit den in Kapitel 4.1.3 genannten Kriterien für die Positionierung modifizierter Nukleoside innerhalb der siRNA zur Optimierung der Effektivität. Allerdings wurden alle der genannten Studien stets unter Verwendung von Transfektionsreagenzien durchgeführt. Da in diesen Studien die siRNA während der Transfektion stets durch einen Polyplex oder ein Lipoplex geschützt wurde, definierte sich deren Effektivität wahrscheinlich hauptsächlich über deren Aktivität. Im Falle der AEA-vermittelten Aufnahme von siRNA ist diese schützende Hülle nicht vorhanden. Für die Aufnahme dieser unverhüllten siRNA sollte daher die Stabilität einen weitaus größeren Einfluss auf die Effektivität haben. Diese Fragestellung wurde im Rahmen der hier durchgeführten Studien näher erforscht.

Zu Beginn wurde der Einfluss der Stabilisierung des *sense*-Strangs und anschließend der Einfluss der Stabilisierung des *antisense*-Strangs auf die Wirksamkeit der LUC-siRNA analysiert. Darüber hinaus wurde der Einfluss einer zusätzlichen AEA-Modifikation des *antisense*-Strangs untersucht. Damit sollte zum einen die Toleranz dieser Position bezüglich der Modifikation untersucht werden. Zum anderen sollte dieses Experiment zeigen, ob ein zusätzlicher Ligand die Aufnahme der siRNA positiv beeinflussen würde. Die unterschiedlich stabilisierten siRNAs AEA-LUC-siRNA2-6 wurden jeweils mit und ohne Tranjektionsreagenz zu den Zellen gegeben. Die Resultate der Studie mit jetPRIME-Transfektion sind in Abbildung 4.11 abgebildet.

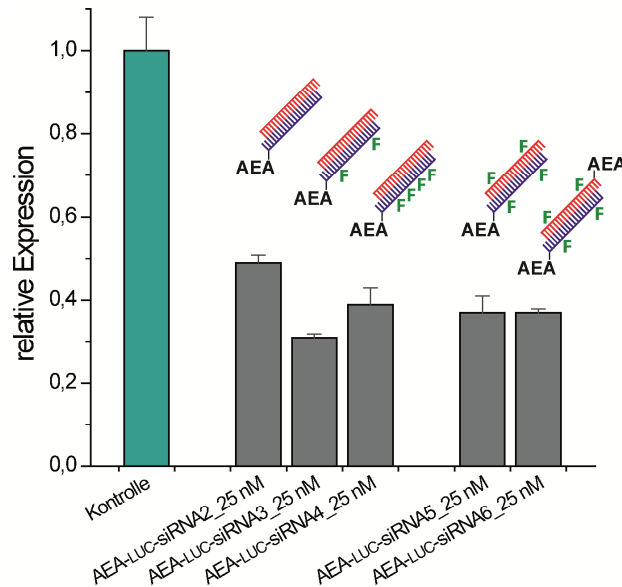


Abbildung 4.11: Effektivität der unterschiedlich stabilisierten LUC-siRNAs bei Transfektion mit jetPRIME. Die abgebildeten Fluoromodifikationen dienen der Veranschaulichung und entsprechen nicht der tatsächlichen Anzahl an Modifikationen. AEA = Anandamid, F = 2'-Fluoro-Nukleotid.

Die Auswirkung zunehmender Stabilität des *sense*-Strangs deckte sich im Fall der jetPRIME-Transfektion mit den Beobachtungen von Wahlestedt.^[70] Die moderate Stabilisierung bei AEA-LUC-siRNA3 erhöhte zunächst die resultierende Effektivität gegenüber AEA-LUC-siRNA2. Die verstärkte Stabilisierung in AEA-LUC-siRNA4 senkte jedoch scheinbar deren Aktivität und führte so insgesamt zu einer reduzierten Effektivität. Im Falle der AEA-vermittelten Aufnahme bestätigte sich die formulierte These, dass in diesem Fall die Stabilisierung einen größeren Einfluss auf die Effektivität hatte. Hier korrelierte die zunehmende Stabilisierung des *sense*-Strangs mit zunehmender Effektivität. Die Resultate dieser Studie sind in Abbildung 4.12 dargestellt.

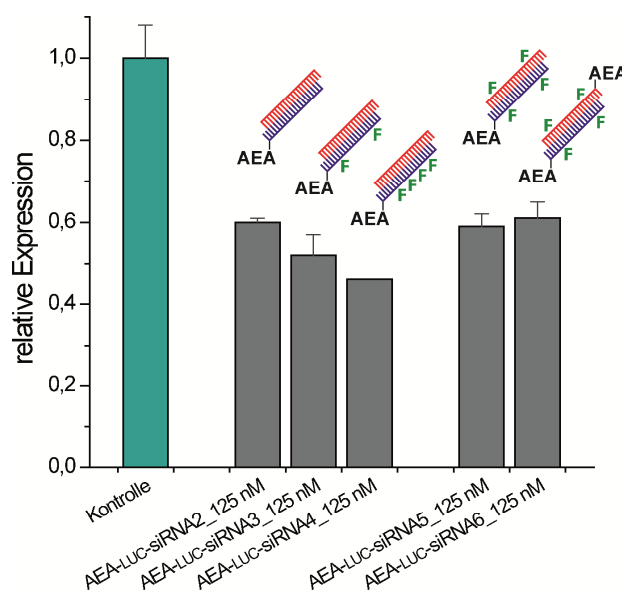


Abbildung 4.12: Effektivität der unterschiedlich stabilisierten LUC-siRNAs bei AEA-vermittelter Aufnahme. Die abgebildeten Fluoromodifikationen dienen der Veranschaulichung und entsprechen nicht der tatsächlichen Anzahl an Modifikationen. AEA = Anandamid, F = 2'-Fluoro-Nukleotid.

Die Stabilisierung des *antisense*-Strangs reduzierte die Effektivität der AEA-LUC-siRNA5 sowohl mit als auch ohne jetPRIME und verdeutlicht damit die geringe Toleranz dieses Strangs gegenüber Modifikationen. Die zusätzliche Modifikation des *antisense*-Strangs mit AEA hatte im Falle der Transfektion mit jetPRIME keinerlei Auswirkung auf die Effektivität der AEA-LUC-siRNA6. Aus dieser Beobachtung lässt sich schließen, dass die Modifikation der siRNA mit AEA am 3'-Überhang des *antisense*-Strangs wie schon am 3'-Überhang des *sense*-Strangs deren Aktivität nicht beeinträchtigt. Im Fall der AEA-vermittelten Aufnahme könnte dies sogar zu einer erhöhten Effektivität führen, da der zusätzliche AEA-Ligand die Wahrscheinlichkeit der Interaktion mit den Cannabinoidrezeptoren erhöhen und dadurch die Aufnahme positiv beeinflussen sollte. Entgegen dieser Annahme führte die zusätzliche AEA-Modifikation bei AEA-LUC-siRNA6 allerdings zu keiner erhöhten Stilllegung der *Renilla*-Luciferase.

Zusammenfassend konnte die Annahme bestätigt werden, dass die Effektivität der siRNA im Falle der AEA-vermittelten Aufnahme dominanter durch deren Stabilität geprägt wird als im Falle der Transfektion mit einem Transfektionsreagenz. Allerdings ließ sich die Effektivität dadurch insgesamt nur begrenzt verbessern. Die Modifikation mit AEA am 3'-Überhang des *antisense*-Strangs hatte keinen negativen Einfluss auf die Aktivität der siRNA. Jedoch ließ sich deren Aufnahme dadurch ebenfalls nicht verbessern.

4.3.4 Regulation mit Hilfe des Adapter-Konstrukts

Im Folgenden wurde versucht, die Expression der *Renilla*-Luciferase innerhalb der adhärennten Mastzellen RBL-2H3 mit Hilfe des Adapter-Konstrukts zu regulieren. Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Anwesenheit einer Disulfidbindung innerhalb des Linkers zwischen AEA und dem Adapter-Konstrukt einen positiven Einfluss auf die Effektivität der Regulation bewirken würde. Wie bereits aufgeführt, sollte sich das Disulfid innerhalb der Zelle aufgrund des reduktiven Milieus öffnen und damit eine erhöhte Verfügbarkeit der siRNA bewirken.^[122]

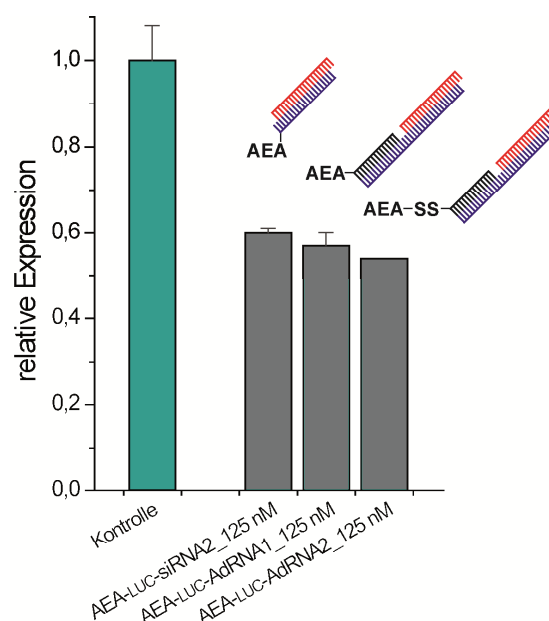


Abbildung 4.13: Regulation der *Renilla*-Luciferase unter Verwendung des Adapter-Konstrukts und des Disulfanyl-Adapter-Konstrukts im direkten Vergleich mit siRNA bei AEA-vermittelter Aufnahme. AEA = Anandamid.

Abbildung 4.13 zeigt die Resultate der Regulation der *Renilla*-Luciferase durch das Adapter-Konstrukt AEA-LUC-AdRNA1 im direkten Vergleich zur entsprechenden AEA-LUC-siRNA2. Daraus wird ersichtlich, dass beide Konjugate eine nahezu identische Effektivität aufwiesen. Das AEA-modifizierte Adapter-Konstrukt wurde demnach durch das *Dicer*-Enzym akzeptiert und zur aktiven siRNA prozessiert, wodurch der prinzipielle Einsatz dieser Strategie erfolgreich gezeigt werden konnte. Wie aus Abbildung 4.13 ersichtlich ist, hatte die Disulfidbindung allerdings keinen Einfluss auf die Effektivität von AEA-LUC-AdRNA2. Dies lässt sich durch verschiedene Argumentationen interpretieren. Das Disulfid erwies sich bereits während der Festphasen-Synthese als äußerst labil. Diese geringe Stabilität lässt den Schluss zu, dass sich das Disulfid bereits vor der Aufnahme in die Zellen teilweise geöffnet haben könnte und dadurch ein geringerer Anteil der siRNA durch die Zellen aufgenommen wurde. Falls die aufgenommenen Adapter-Konstrukte aufgrund der verstärkten Freisetzung eine höhere Aktivität aufwiesen, so könnte dies insgesamt in einer nahezu gleichbleibenden Effektivität resultieren. Eine plausible Erklärung ist allerdings, dass die intrazelluläre Verfügbarkeit des Adapter-Konstrukts durch die reduktive Spaltung des Disulfids nicht weiter erhöht wurde. Dies würde bedeuten, dass die Verfügbarkeit von AEA-modifizierten Oligonukleotiden innerhalb der Zellen nicht oder nur geringfügig durch die intrazellulären Transportprozesse und den enzymatischen Abbau von AEA beeinträchtigt werden.

4.3.5 Regulation mit Arachidonylethylenglykol- und Retroanandamid-siRNA

Nachdem sich die Effektivität der siRNA durch Verwendung des Disulfanyl-Adapter-Konstrukts nicht erhöhen ließ, wurde im nächsten Schritt ein möglicher positiver Einfluss der AEA-Analoga Arachidonylethylenglykol (AEG) und Retroanandamid (RAEA) untersucht. Die Resultate dieser Studie sind in Abbildung 4.14 dargestellt. Wie in Kapitel 4.1.4 eingehend vorgestellt, wird AEG neben der Hydrolase FAAH zusätzlich durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert. Dies bewirkt einen verstärkten Konzentrationsgradienten zwischen extra- und intrazellulärem Bereich gegenüber dem Konzentrationsgradienten von AEA und führt dadurch zu einer erhöhten Aufnahme von AEG. Falls die AEG-Modifikation der siRNA ebenfalls verstärkt hydrolysiert wird, so sollte dies zu einer erhöhten Aufnahme und damit zu einer erhöhten Effektivität von AEG-siRNA gegenüber AEA-siRNA führen.

Wie in Abbildung 4.14 ersichtlich, reduzierte AEG-LUC-siRNA die Expression der *Renilla*-Luciferase nahezu identisch wie AEA-LUC-siRNA3. Bedenkt man, dass AEA und AEG eine ähnliche Affinität bezüglich der Cannabinoidrezeptoren^[225] aufweisen und dass AEG bei erfolgreicher Hydrolyse stärker aufgenommen wird als AEA, so führt dies zu folgender Schlussfolgerung: Die AEG-Modifikation der siRNA ist ebenso wie die AEA-Modifikation kein Substrat für die Hydrolase FAAH und wird auch durch weitere intrazelluläre Esterasen nicht hydrolysiert. Aufgrund der vergleichbaren Affinität bezüglich des Cannabinoidrezeptors^[225] werden beide siRNAs gleich effektiv aufgenommen und führen dadurch zu einer identischen Regulation der *Renilla*-Luciferase. Die identische Effektivität ließe sich auch dadurch erklären, dass AEG-LUC-siRNA und AEA-LUC-siRNA3 in gleicher Weise hydrolysiert wurden. Dieser Annahme widerspricht allerdings die Effektivität der ebenfalls verwendeten RAEA-LUC-siRNA. Wie in Abbildung 4.14 zu erkennen, besitzt diese eine nahezu identische Effektivität wie AEG-LUC-siRNA und AEA-LUC-siRNA3. RAEA ist kein Substrat für die Hydrolase FAAH^[196] und hat sich darüber hinaus im Vergleich zu AEA als äußerst hydrolasestabil erwiesen.^[227] Da RAEA ebenfalls eine ähnliche Affinität wie AEA bezüglich der Cannabinoidrezeptoren aufweist,^[196] deckt sich die ähnliche Effektivität von AEA-siRNA, AEG-siRNA und RAEA-siRNA mit der oben aufgestellten Schlussfolgerung, dass weder

die AEA-Modifikation noch die AEG-Modifikation der siRNA hydrolysiert wurde. Zusammenfassend konnten weder AEG-siRNA noch RAEA-siRNA eine höhere Regulation der *Renilla*-Luciferase gegenüber AEA-siRNA bewirken.

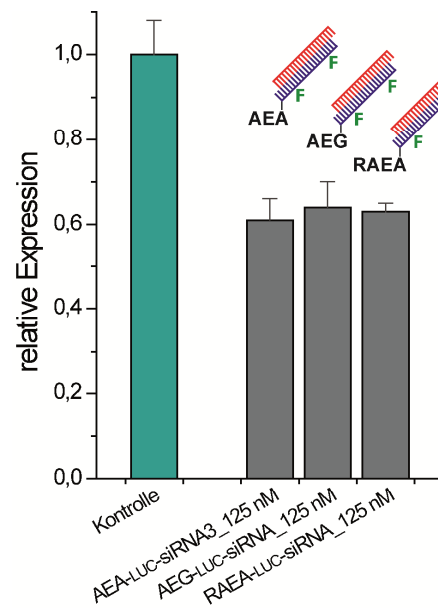


Abbildung 4.14: Einfluss der Variation des Liganden auf die Effektivität der siRNA. AEA = Anandamid, AEG = Arachidonoyl-ethylenglykol, RAEA = Retroanandamid.

4.4 Verzweigte siRNA-Strukturen

Die in Kapitel 4.3 vorgestellten Experimente beschreiben erstmals die erfolgreiche Regulation eines Gens durch die AEA-vermittelte Aufnahme von siRNA in Immunzellen. Dabei konnte ein konzentrationsabhängiger Regulationseffekt mit einer maximalen Reduktion der Renilla-Expression um ca. 50 % festgestellt werden. Die AEA-vermittelte Regulation erwies sich zudem über den gesamten Konzentrationsbereich effektiver als die Regulation mit Hilfe des Cholesterol-siRNA Konjugats. Diverse Optimierungsversuche hinsichtlich der Stabilität, der intrazellulären Verfügbarkeit und der Aufnahme der siRNA konnten deren Effektivität allerdings nur bedingt erhöhen. Im Rahmen dieser Experimente wurde die These aufgestellt, dass die maximale Effektivität maßgeblich durch die begrenzte Aufnahmefähigkeit des Transportsystems verursacht wurde.

Als Konsequenz müsste die Anzahl der siRNAs pro AEA-Modifikation erhöht werden, um eine erhöhte Effektivität zu erzielen. Auf diese Weise könnten durch die Aufnahme einer AEA-Modifikation mehrere Duplexe in die Zelle transportiert werden.

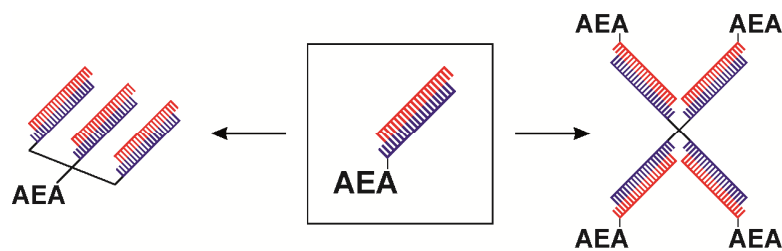


Abbildung 4.15: Ausbau der AEA-siRNA zu verzweigten siRNA-Strukturen. **Rechte Struktur:** Konstantes Verhältnis von AEA-Modifikation und siRNA-Duplex und räumliche Trennung durch starres Grundgerüst. Konstruktion durch Click-Reaktion zwischen einem Tetraazid und Alkin-sense-RNA gefolgt von Hybridisierung mit AEA-antisense-RNA. **Linke Struktur:** Kompakte siRNA-Verzweigung mit einer einzelnen AEA-Modifikation (Grundgerüst von Johannes Harder). Konstruktion durch Click-Reaktion zwischen einem AEA-Triazid und Alkin-sense-RNA gefolgt von Hybridisierung mit antisense-RNA. sense-RNA = blau, antisense-RNA = rot, AEA = Anandamid.

Um dieses Postulat zu untersuchen, wurden vier AEA-modifizierte siRNA-Duplexe über ein starres Grundgerüst miteinander verbunden (Abbildung 4.15, rechts). Durch das konstante Verhältnis von AEA-Modifikation zu siRNA-Duplex innerhalb dieser verzweigten siRNA-Struktur sollte die gleiche Wahrscheinlichkeit für eine Interaktion mit dem Cannabinoidrezeptor bzw. dem Transportsystem im Vergleich zum einfachen Duplex gewährleistet werden. Die maximal aufgenommene Menge an siRNA sollte im Vergleich zum Duplex allerdings viermal so hoch sein. Falls dieses sperrigere Konstrukt die Aufnahme im Vergleich zum einfachen Duplex nicht übermäßig beeinträchtigt, sollte sich dadurch die resultierende RNA-Interferenz erhöhen.

Johannes Harder konstruierte auf der Basis des oben aufgestellten Postulats eine weitere verzweigte siRNA-Struktur zur gesteigerten Aufnahme des von ihm entwickelten siRNA-Folsäure Konjugats in Krebszellen.^[222] Das Grundgerüst dieser Struktur wurde ebenfalls zur Steigerung der AEA-vermittelten Aufnahme von siRNA übernommen (Abbildung 4.15, links). Bei dieser Struktur wurde die Anzahl der siRNA-Duplexe verdreifacht und anstelle des sperrigen Grundgerüsts eine weitaus kompaktere Struktur gewählt. Die Wahrscheinlichkeit der Interaktion dieses Konstrukts mit dem Cannabinoidrezeptor bzw. dem Transportsystem im Vergleich zum einfachen Duplex wurde dadurch auf ein

Drittel reduziert. Allerdings wird hier durch die Aufnahme von einer AEA-Modifikation die dreifache Menge an siRNA in die Zelle transportiert. Falls die reduzierte Interaktionsmöglichkeit dieses Konstrukts mit dem Cannabinoidrezeptor bzw. dem Transportsystem die Aufnahme nicht übermäßig beeinträchtigt, sollte sich dadurch die resultierende RNA-Interferenz erhöhen. Diese Struktur könnte zudem aufgrund der kompakteren Morphologie leichter in die Zellen transportiert werden als die sperrige vierfach AEA-modifizierte Struktur.

Die Konstruktion dieser in Abbildung 4.15 dargestellten Strukturen sollte durch den Einsatz von Mehrfach-Aziden als Grundgerüst ebenfalls mit Hilfe der Click-Chemie möglich sein. Im folgenden Text werden zu Beginn die Charakteristika und die Synthese der hierfür verwendeten Mehrfach-Azide beschrieben. Im Anschluss daran wird die Optimierung der Click-Reaktion mit Mehrfach-Aziden vorgestellt. Das Kapitel schließt mit der Konstruktion der verzweigten siRNA-Strukturen.

4.4.1 Synthese von Porphyrin-Tetraazid und Anandamid-Triazid

Der folgende Abschnitt beschreibt die Synthese der Mehrfachazido-Bausteine Porphyrin-Tetraazid **32** und Anandamid-Triazid **33** zur Konstruktion der verzweigten siRNA-Strukturen (Abbildung 4.16). Als Grundgerüst der vierfach AEA-modifizierten Struktur wurde ein Porphyrin gewählt, da die starre Geometrie des Porphyrins eine definierte Struktur und die räumliche Trennung der AEA-Modifikationen gewährleisten sollte. Darüber hinaus sollte das Porphyrin aufgrund seines hydrophoben Charakters dazu beitragen, die Aufnahme der verzweigten siRNA-Struktur zu erleichtern. Dies könnte die Beeinträchtigung der Aufnahme aufgrund der sperrigen Morphologie teilweise kompensieren. Das AEA-Triazid **33** wurde unter Verwendung des von *Johannes Harder* synthetisierten Triazido-Amin-Grundgerüsts **34** konstruiert.^[222] *Johannes Harder* konstruierte diese Struktur analog zu dem bisher eingesetzten kommerziellen Monoazido-Ethylenglykol-Linker **6**, da sich dieser Linker sowohl im Fall von AEA als auch bei der von ihm verwendeten Folsäure für die zelluläre Aufnahme von siRNA bereits bewährt hatte. Anders als bei Porphyrin-Tetraazid **32** sind die Azide hier räumlich sehr lokalisiert. Die daraus resultierende verzweigte siRNA-Struktur sollte eine wesentlich kompaktere Morphologie als das sperrige Porphyrin-Konstrukt aufweisen. Dies könnte sich positiv auf die Aufnahme auswirken. Die anisotrope Struktur des AEA-Triazids **33** sollte darüber hinaus die AEA-Modifikation von der verzweigten siRNA-Einheit abgrenzen und damit deren Interaktion mit dem Cannabinoidrezeptor bzw. dem Transportsystem verbessern.

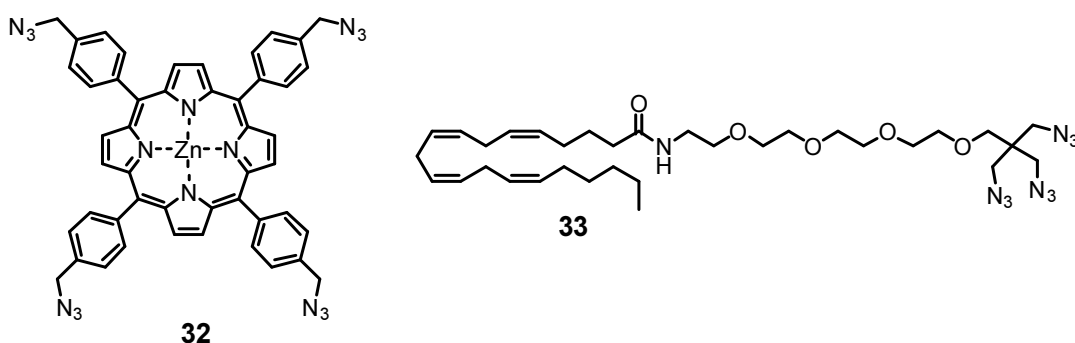
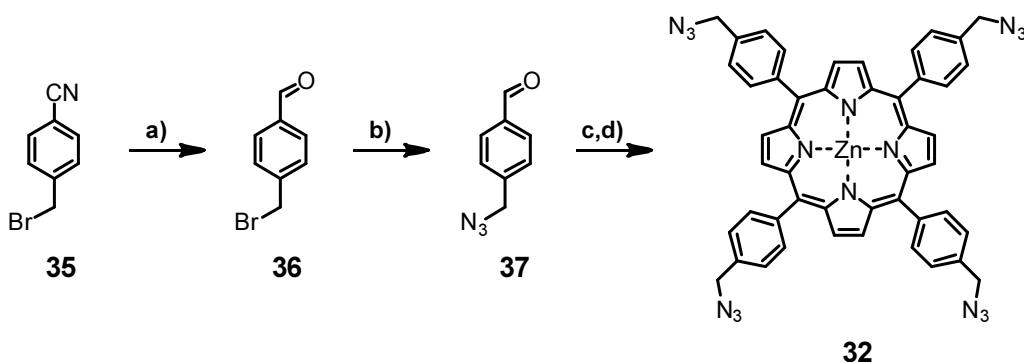


Abbildung 4.16: Mehrfach-Azido Bausteine Porphyrin-Tetraazid **32** und Anandamid-Triazid **33** zur Konstruktion der verzweigten siRNA-Strukturen.

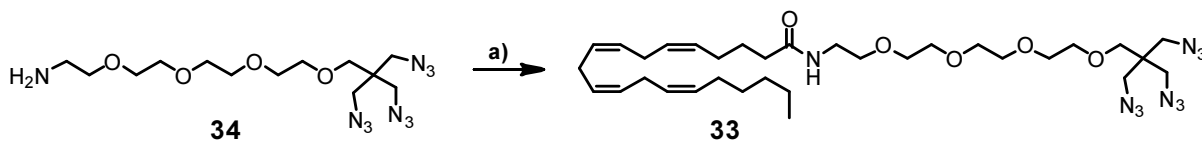
Ein Nachteil von Porphyrinen ist ihre generell schlechte Löslichkeit speziell in polaren Lösungsmitteln. Die Ursache liegt in starken intermolekularen π - π -Wechselwirkungen, welche zu schwerlöslichen Aggregaten führen. Um eine Click-Reaktion mit Oligonukleotiden in polaren Lösungsmitteln zu ermöglichen, wurde die Löslichkeit des Azidoporphyrins folgendermaßen optimiert: Zum Einen wurde Tetraphenylporphyrin (TPP) als Porphyringerüst gewählt, da hier durch die orthogonal ausgerichteten Phenylringe die π - π -Wechselwirkungen reduziert und damit die Aggregation herabgesetzt wird. Zum Anderen wurde die Löslichkeit des Tetraphenylporphyrins durch Insertion eines Zink(II)-Ions weiter verbessert, da sich dadurch die planare Struktur des Makrozyklus verzerrt und dies ebenfalls die π - π -Wechselwirkungen reduziert.^[229] Die Synthese des gewählten Porphyrin-Tetraazid **32** ist in Schema 4.7 aufgeführt. Dabei lässt sich die C_{2h} -Symmetrie des Porphyrins nutzen und reduziert die Anzahl der benötigten Bausteine auf einen Azidoaldehyd und Pyrrol.



Schema 4.7: Synthese von Porphyrin-Tetraazid **32** ausgehend von 4-(Bromomethyl)benzonitril **35**. a) Dibal-*H*, Toluol, 3 h, 0 °C, 83 %, b) NaN₃, Aceton/H₂O, 24 h, 70 °C, 68 %, c) Pyrrol, Propionsäure, 30 min, 120 °C, 9 %, d) Zn(OAc)₂, DCM/MeOH, 1 h, RT, 93 %.

4-(Bromomethyl)benzonitril **35** wurde basierend auf einer Vorschrift von *van Esch*^[230] zum korrespondierenden Aldehyd **36** reduziert und anschließend nach einer Vorschrift von *Guilard*^[231] zu Azidobenzaldehyd **37** funktionalisiert. Die selektive Reduktion zu Benzaldehyd **36** wurde durch die exakte Zugabe von einem Äquivalent Dibal-*H* bei 0 °C gewährleistet. Höhere Temperaturen bzw. weitere Hydrid-Äquivalente führten in einer Folgereaktion zur Ausbildung des korrespondierenden Benzylamins. Die nukleophile Substitution des Bromids durch ein Azid nach *Guilard*^[231] wurde in einer soliden Ausbeute von 68 % durchgeführt. Neben thermischer Zersetzung des Benzaldehyds aufgrund der harschen Reaktionsbedingungen könnte dabei die Addition des Nukleophils an den Aldehyd zu einer Minderung der Ausbeute geführt haben. Das Porphyrin **38** wurde anschließend unter *Adler-Longo* Bedingungen^[232] bei Verwendung von frisch destilliertem Pyrrol nach einer Vorschrift von *Mizutani*^[233] synthetisiert. Dabei kondensierten der Benzaldehyd **37** und Pyrrol in siedender Propionsäure zum korrespondierenden Porphyrin **38**. Die äquimolare Einwaage von Pyrrol und Azidobenzaldehyd **37** lieferte das gewünschte Azido-Porphyrin **38** als Hauptprodukt in einer für Porphyrine akzeptablen Ausbeute von 9 %. Durch Insertion eines Zink(II)-Ions nach einer Vorschrift von *El-Khouly*^[234] konnte schließlich das gewünschte Metalloporphyrin **32** gewonnen werden. Wie angestrebt, wies das Metalloporphyrin **32** gegenüber Porphyrin **38** eine deutlich erhöhte Löslichkeit auf. So verhielt sich Porphyrin **38** in DMSO nahezu unlöslich wohingegen das Metalloporphyrin **32** bis zu einer Konzentration von 50 mM angelöst werden konnte.

Die Synthese des Anandamid-Triazids **33** erfolgte ausgehend von Arachidonsäure **2** durch Amidkupplung mit Triazidoamin **34** und ist in Schema 4.8 aufgeführt. Das hierfür benötigte Triazidoamin **34** wurde freundlicherweise von *Johannes Harder* zur Verfügung gestellt.



Schema 4.8: Synthese des Anandamid-Triazids **33** ausgehend von Triazidoamin **34**. a) TBTU, DIPEA, DMF, 16 h, RT, 95 %.

4.4.2 Click-Reaktion eines Mehrfachazids mit Oligonukleotiden

Der folgende Abschnitt beschreibt die Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Konstruktion verzweigter Oligonukleotid-Strukturen mittels Click-Chemie. Als Mehrfachazid wurde dazu Porphyrin-Tetraazid **32** verwendet. Im Rahmen dieser Optimierung wurde eine Alkin-modifizierte DNA verwendet, da diese wie bereits erwähnt wesentlich preiswerter und zudem robuster als Alkin-modifizierte RNA ist. Abbildung 4.17a veranschaulicht die Konstruktion der verzweigten DNA-Struktur TPP(DNA)₄ mit Tetraphenylporphyrin als Grundgerüst. In Abbildung 4.17b sind schematisch alle möglichen Produkte dieser Click-Reaktion dargestellt. Ziel der hier vorgestellten Studie war die Optimierung der Reaktionsbedingungen zur selektiven Bildung von TPP(DNA)₄ anstelle der ungewünschten Nebenprodukte TPP(DNA)₁₋₃.

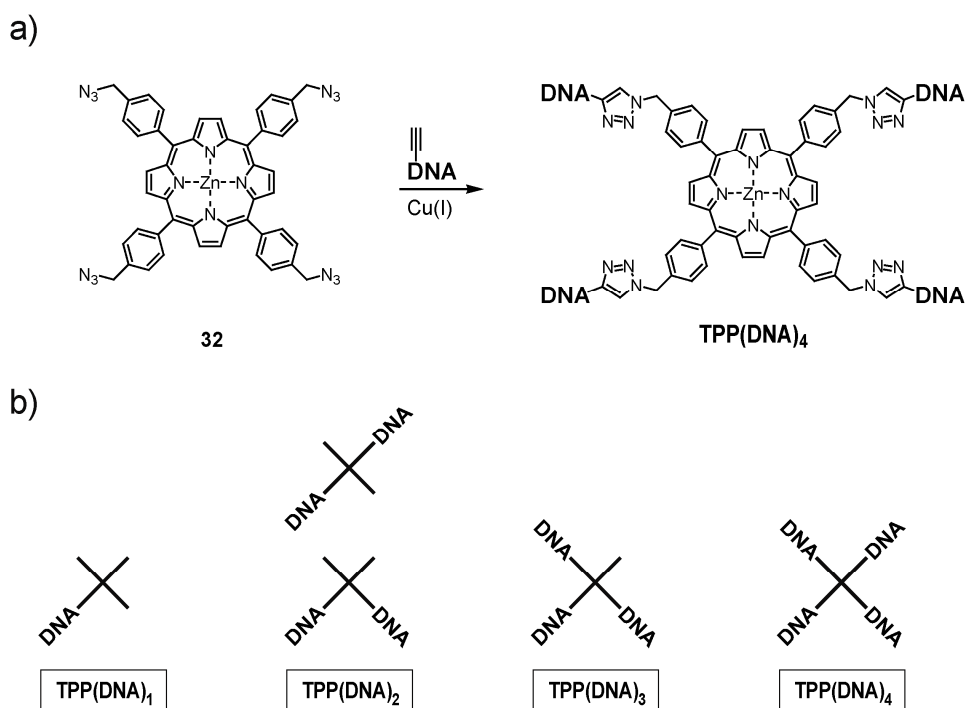


Abbildung 4.17: a) Click-Reaktion zwischen Porphyrin-Tetraazid **32** und Alkin-modifizierter DNA zur Konstruktion einer verzweigten DNA-Struktur TPP(DNA)₄ mit Porphyrin als Kernelement. b) Schematische Darstellung aller möglichen Reaktions-Produkte TPP(DNA)₁₋₄.

Für gewöhnlich wird während der Click-Modifikation von Oligonukleotiden das entsprechende Azid im Überschuss eingesetzt. Dadurch soll eine möglichst quantitative Modifikation des Oligonukleotids gewährleistet werden, da dieses meist wesentlich aufwändiger und kostenintensiver herzustellen ist als das verwendete Azid. Die überschüssige Verwendung des Porphyrin-Tetraazid **32** würde hier allerdings das monfunktionalisierte TPP(DNA)₁ als statistisches Hauptprodukt zur Folge haben. Die Ausbildung von TPP(DNA)₄ als Hauptprodukt der Click-Reaktion sollte durch den äquimolaren Einsatz von Azid und Alkin bzw. durch einen Überschuss an Alkin möglich sein. Diese Maßnahme könnte sich jedoch negativ auf die Ausbeute der Click-Reaktion auswirken.

Um dies näher zu untersuchen, wurde das Porphyrin-Tetraazid **32** bezogen auf das Azid zuerst im Überschuss und anschließend äquimolar mit dem Alkin-modifizierten DNA-5mer ODN16 zur Reaktion gebracht. ODN16 wurde freundlicherweise von der Firma *baseclick GmbH* zur Verfügung gestellt. Dieses DNA-5mer wurde als Modellstrang für die Optimierung der Click-Reaktionen gewählt, da es neben Oktadiinyl-Desoxyuridin die vier dominanten natürlichen Desoxynukleotide dA,dC,dG und dT enthält und somit das kürzeste Alkin-Oligonukleotid mit allen relevanten Funktionalitäten darstellte. Die geringe Masse von ODN16 stellte darüber hinaus eine erhebliche Erleichterung der Massenspektroskopie des angestrebten Produkts TPP(ODN16)₄ dar.

Durch die Verwendung von verschiedenen Lösungsmittelgemischen aus DMSO, Wasser und *tert*-Butanol wurde versucht, das Porphyrin-Tetraazid **32** für die geplante Click-Reaktion möglichst konzentriert anzulösen. Die in reinem DMSO erzielte Konzentration von 50 mM konnte dadurch jedoch nicht weiter erhöht werden. Für das Anlösen von ODN16 und Kupferbromid mit TBTA wurde ebenfalls reines DMSO als Lösungsmittel verwendet, da in Anwesenheit von Wasser und *tert*-Butanol das Porphyrin-Tetraazid **32** bei Zugabe zur Click-Lösung teilweise präzipitierte. Die Click-Reaktion wurde somit vollständig in reinem DMSO durchgeführt. In einem ersten Ansatz wurden Porphyrin-Tetraazid **32** und ODN16 im Verhältnis fünf zu eins eingesetzt. Dies entsprach einem 20-fachen Überschuss an Aziden pro Alkin. In einem zweiten Ansatz wurden Azid und Alkin äquimolar eingesetzt und somit 0.25 Äquivalente Porphyrin-Tetraazid **32** zu ODN16 gegeben. Tabelle 4.4 fasst die Molekulargewichte von ODN16 sowie aller möglichen Produkte TPP(ODN16)₁₋₄ der Click-Reaktion zusammen.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	m/z (ber.)
ODN16	XGCAT	1567.3
TPP(ODN16) ₁	X+(XGCAT) ₁	2463.5
TPP(ODN16) ₂	X+(XGCAT) ₂	4030.8
TPP(ODN16) ₃	X+(XGCAT) ₃	5598.1
TPP(ODN16) ₄	X+(XGCAT) ₄	7165.4

Tabelle 4.4: Sequenzen und berechnete Molekulargewichte von ODN16 und der möglichen Produkte TPP(ODN16)₁₋₄ nach Click-Reaktion mit Tetraazido-Porphyrin **32**. X = Oktadiinyl-Desoxyuridin, TPP = Tetraphenylporphyrin.

Nach standardmäßiger Aufarbeitung der Click-Reaktion durch Ethanol-Fällung wurden beide Reaktionsansätze mittels HPLC und MALDI-TOF analysiert. Wie bereits in Abbildung 4.17b aufgeführt, sind bei der Reaktion von Porphyrin-Tetraazid **32** mit ODN16 prinzipiell fünf verschiedene Produkte möglich: Das Porphyrin **32** kann mit eins bis vier Oligonukleotiden eine Cycloaddition eingehen und so die Produkte TPP(ODN16)₁₋₄ ausbilden wobei für TPP(ODN16)₂ zwei unterschiedliche Konfigurationen

möglich sind. Abbildung 4.18 zeigt die HPLC-Chromatogramme und die zugehörigen MALDI-TOF-Spektrogramme bei a) überschüssigem Einsatz und b) äquimolarem Einsatz von Porphyrin-Tetraazid **32** gegenüber ODN16 nach der Ethanol-Fällung.

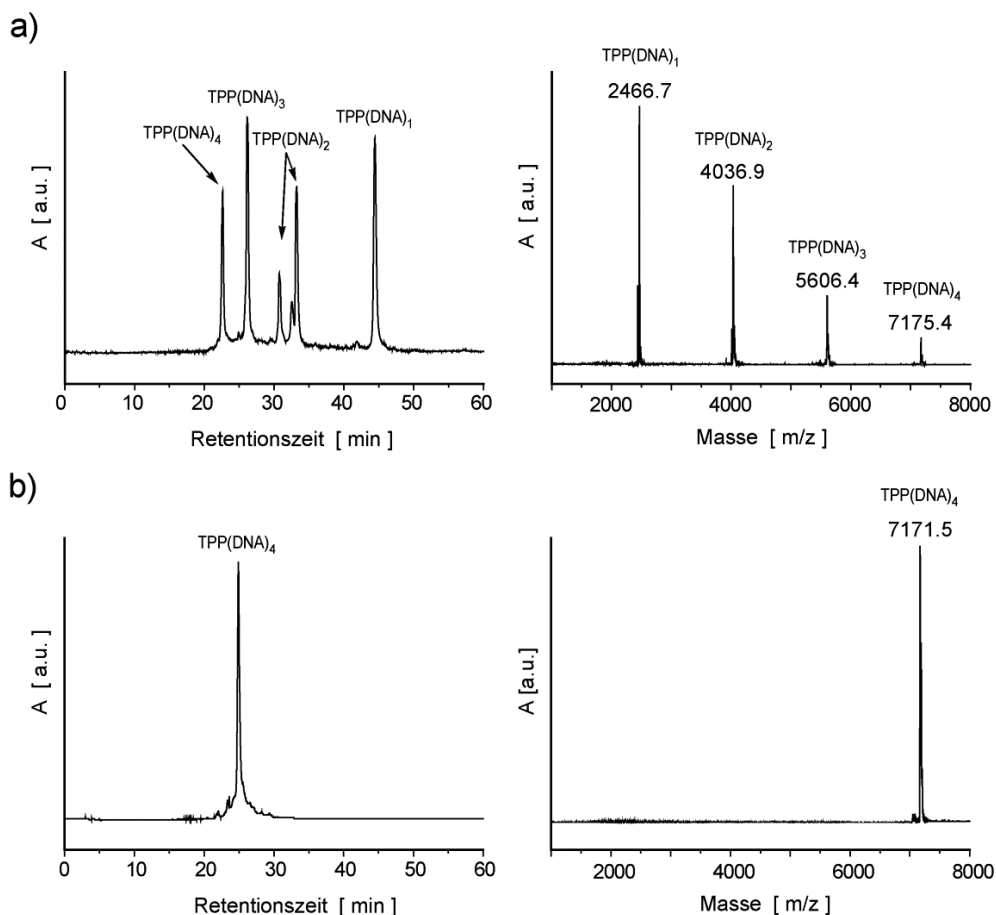


Abbildung 4.18: HPLC Chromatogramm und MALDI-TOF Spektrogramm der Click-Reaktion von Porphyrin-Tetraazid **32** und ODN16 nach Ethanol-Fällung. **a)** 20-facher Überschuss Azid gegenüber Alkin (= 5 Äquivalente Porphyrin-Tetraazid **32**). **b)** Äquimolarer Einsatz von Azid und Alkin (= 0.25 Äquivalente Porphyrin-Tetraazid **32**). HPLC-Gradient 0 → 100 % Puffer B in 0 min → 45 min.

Wie aus Abbildung 4.18a klar ersichtlich ist, ließen sich bei überschüssiger Verwendung von Porphyrin-Tetraazid **32** alle fünf möglichen Produkte nachweisen. Die äquimolare Verwendung führte hingegen wie erhofft ausschließlich zur Bildung des gewünschten Produkts TPP(ODN16)₄ (Abbildung 4.18b). Erstaunlicherweise konnte in beiden Ansätzen kein Edukt ODN16 nach der Aufarbeitung detektiert werden. Dies belegt eindrucksvoll das Potential der kupferkatalysierten Modifikation von Oligonukleotiden, da selbst der äquimolare Einsatz von Azid und Alkin zu quantitativer Umsetzung führte.

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieser Studie die Reaktionsbedingungen für eine effiziente Synthese verzweigter Oligonukleotid-Strukturen unter Verwendung der kupferkatalysierten Click-Reaktion erarbeitet: Die äquimolare Reaktion eines Mehrfach-Azids mit einem Alkin-modifizierten Oligonukleotid führt selektiv zur Bildung des gewünschten Produkts ohne dabei den Umsatz der Reaktion zu beeinträchtigen.

4.4.3 Verzweigte Luciferase-siRNA

Auf Basis der in Kapitel 4.4.2 gewonnenen Erkenntnisse wurden im nächsten Schritt die verzweigten Luciferase-siRNAs konstruiert. Dazu wurden Porphyrin-Tetraazid **32** und AEA-Triazid **33** äquimolar mit LUC-sense2-Strang ORN07 mittels Click-Reaktion zu den entsprechenden verzweigten Strukturen verbunden. Im Anschluss daran wurden die verzweigten Luciferase-siRNAs durch Hybridisierung mit den jeweiligen *antisense*-Strängen ausgebildet. Tabelle 4.5 fasst die so konstruierten verzweigten Luciferase-siRNAs zusammen.

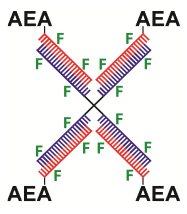
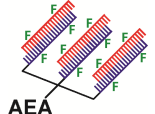
Bezeichnung	Strang	Sequenz (sense / antisense)	Struktur
TPP-LUC-siRNA	32+(ORN07) ₄ ORN11	5' - GGC-CUU-U <u>CA</u> -CUA-CUC-CUA-C <u>X</u> T +32 3' - TTCCG-GAA-AGU-GAU-GAG-GAU-G	
AEA-TPP-LUC-siRNA	32+(ORN07) ₄ ORN05+5	5' - GGC-CUU-U <u>CA</u> -CUA-CUC-CUA-C <u>X</u> T +32 3' - T <u>X</u> CCG-GAA-AGU-GAU-GAG-GAU-G +5	
AEA-Tri-LUC-siRNA	33+(ORN07) ₃ ORN04	5' - GGC-CUU-U <u>CA</u> -CUA-CUC-CUA-C <u>X</u> T +33 3' - T <u>U</u> CCG-GAA-AGU-GAU-GAG-GAU-G	

Tabelle 4.5: Verzweigte Luciferase-siRNAs mit den zugehörigen Sequenzen. Die Modifikation der siRNA erfolgte durch Cycloaddition der entsprechenden Azide an das Alkinnukleosid X des jeweiligen Einzelstrangs. N = Desoxyribonukleosid, N = Ribonukleosid, N = 2'-Fluoronukleosid, X = 2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridin. AEA = Anandamid, TPP = Tetraphenylporphyrin.

4.4.4 Glycosylierte Luciferase-siRNA

Wie bereits aufgeführt, wird die Effektivität der RNA-Interferenz maßgeblich durch die Stabilität der siRNA begrenzt. Dies begründet sich darin, dass siRNA aufgrund ihrer geringen Nuklease-Resistenz *in vitro* und *in vivo* nur eine geringe Lebensdauer aufweist.^[62a, 64] Die siRNA wird dabei hauptsächlich vom 3'-Ende ausgehend durch 3'-Exonukleasen hydrolisiert.^[235] Diese anfälligste Position hat zugleich den geringsten Einfluss auf die Aktivität des RISC.^[61-62, 67] Somit beschreibt das 3'-Ende der siRNA die bestmögliche Position zur Stabilisierung der siRNA durch geeignete Modifikation. Einen vielversprechenden Kandidaten zur Steigerung der Exonuklease-Resistenz stellte dabei Glucose dar: *Richardson* konnte anhand von Bakteriophagen in *E. coli* zeigen, dass die Glycosylierung von DNA zu einer erheblichen Steigerung der Exonuklease-Resistenz führt.^[236] Die Glycosylierung der DNA erfolgt innerhalb der Phagen durch Funktionalisierung von Hydroxymethyl-Cytidin durch Mono-, Di- oder Tri-Glucose (Abbildung 4.19a) und bewirkt dadurch eine bis zu 20-fach erhöhte Resistenz gegenüber Exonukleasen.^[236] Die erhöhte Exonuklease-Resistenz durch Glycosylierung konnte von *Nagasaki* auch bei kurzen Oligonukleotiden ebenfalls nachgewiesen werden.^[237] So besaß ein dT-20mer in Serumhaltigen Medium eine Halbwertszeit von ca. 20 min und wurde innerhalb der drei Stunden nahezu vollständig abgebaut, wohingegen das endständig monoglycosylierte dT-20mer über drei Stunden weitestgehend erhalten blieb. Eine Glycosylierung der AEA-siRNA am 3'-Ende sollte daher ebenfalls deren 3'-Exonuklease-Resistenz erhöhen und damit die Effektivität der RNA-Interferenz steigern.

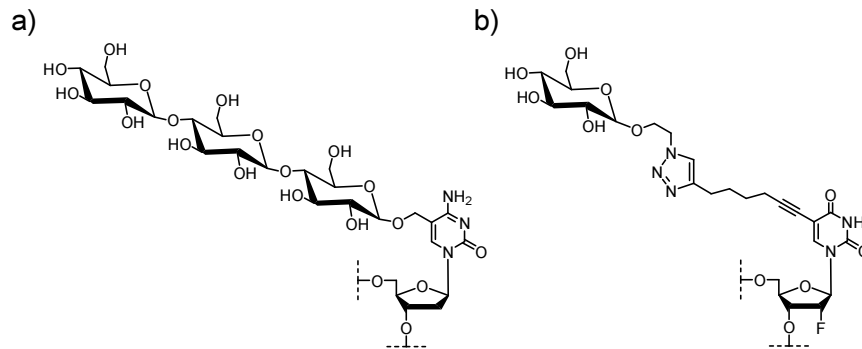


Abbildung 4.19: a) Triglycosyliertes Hydroxymethyl-Cytidin. Mono- bis Triglycosiliertes Hydroxymethyl-Cytidin dient in Bakteriophagen zur Erhöhung der Exonuklease-Resistenz. b) Konstruktion des glycosylierten Strukturmotivs durch Cycloadition eines Glucose-Azids **39** an 2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridin.

Wie in Abbildung 4.19 dargestellt, lässt sich das Strukturmotiv von glycosiliertem Hydroxymethyl-Cytidin auch durch Glycosylierung des Oktadiinyl-Nukleotids erzeugen. Das hierfür benötigte Glucose-Azid **39** wurde freundlicherweise von *Felix Gnerlich* zur Verfügung gestellt. Mit Hilfe dieses Azids wurde der *antisense*-Strang mit Glucose modifiziert und anschließend mit dem AEA-modifizierten *sense*-Strang hybridisiert. Mit Hilfe des glycosylierten *antisense*-Strangs wurde neben dem einfachen Duplex ebenfalls eine verzweigte siRNA mit Glucose-Modifikation konstruiert. Dazu wurde AEA-Triazid **33** äquimolar mit LUC-*sense*2-Strang ORN07 mittels Click-Reaktion zu den entsprechenden verzweigten Strukturen verbunden. Im Anschluss daran wurde die verzweigte Luciferase-siRNA durch Hybridisierung mit dem glycosylierten *antisense*-Strang ausgebildet. Die glycosilierten Luciferase-siRNAs sind in Tabelle 4.6 aufgeführt.

Bezeichnung	Strang	Sequenz (<i>sense</i> / <i>antisense</i>)	Struktur
AEA-Gluc-LUC-siRNA	ORN07+5 ORN05+39	5' -GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CXT +5 3' -TXCCG-GAA-AGU-GAU-GAG-GAU-G +39	
AEA-Gluc-Tri-LUC-siRNA	33+(ORN07) ₃ ORN05+39	5' -GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CXT +33 3' -TXCCG-GAA-AGU-GAU-GAG-GAU-G +39	

Tabelle 4.6: Glycosylierte Luciferase-siRNAs mit den zugehörigen Sequenzen. Die Modifikation der siRNA erfolgte durch Cycloaddition der entsprechenden Azide an das Alkinnukleosid **X** des jeweiligen Einzelstrangs. N = Desoxyribonukleosid, **N** = Ribonukleosid, **N** = 2'-Fluoronukleosid, **X** = 2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridin. AEA = Anandamid, Gluc = Glucose.

4.5 Luciferase-Assays II

Das folgende Kapitel beschreibt die Regulation *Renilla*-Luciferase unter Verwendung der verzweigten siRNA-Strukturen. Dabei wird zu Beginn anhand des Porphyrin-Konstrukts die Auswirkung der Verzweigung auf die Aktivität der siRNA und auf deren Aufnahme vorgestellt. Im Anschluss daran wird die Regulations-Fähigkeit beider verzweigten Strukturen hinsichtlich ihrer Morphologie und der Anzahl an AEA-Modifikationen diskutiert. Das Kapitel schließt mit der Regulation der *Renilla*-Luciferase durch glycosilierte siRNA. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich bei allen vorgestellten Studien stets den LUC-siRNA-Duplex und nicht auf die unterschiedlichen Konstrukte. Somit wurde die eingesetzte Molmenge der verzweigten Struktur AEA-TPP-LUC-siRNA stets auf ein Viertel reduziert, da diese Struktur vier siRNA-Duplexe beinhaltet. Die eingesetzte Molmenge der verzweigten Struktur AEA-Tri-LUC-siRNA wurde dementsprechend stets auf ein Drittel reduziert.

4.5.1 Regulation mit verzweigter Luciferase-siRNA

Für die Regulation der *Renilla*-Luciferase durch eine verzweigte siRNA-Struktur wurde in erster Instanz das vierfach AEA-modifizierte Konstrukt AEA-TPP-LUC-siRNA verwendet, da hier das Verhältnis von AEA-Modifikation und siRNA im Vergleich zum einfachen Duplex konstant bleibt. Dadurch ließ sich der Effekt der verzweigten Struktur besser erfassen als im Fall von AEA-Tri-LUC-siRNA, welches neben der erhöhten Anzahl von siRNAs pro AEA-Modifikation zusätzlich ein verändertes Verhältnis von AEA-Modifikation und siRNA aufweist. Vor dem eigentlichen Regulations-Experiment wurden die verzweigten siRNA-Strukturen mit Hilfe des Transfektionsreagenzes jetPRIME transfiziert, um die Aufnahme der siRNA-Strukturen in die Zellen sicherzustellen.

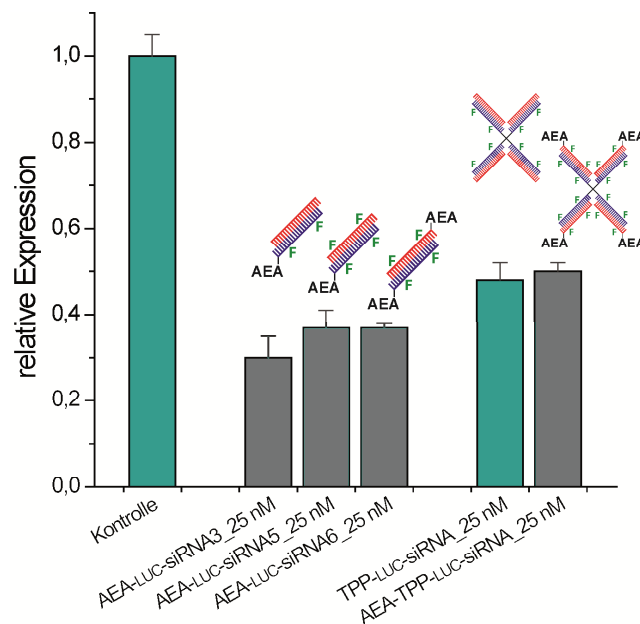


Abbildung 4.20: Einfluss der Verzweigung von AEA-TPP-LUC-siRNA auf die Aktivität der siRNA. Die erfolgreiche Transfektion aller Konstrukte wurde durch das Transfektionsreagenz jetPRIME gewährleistet. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf den LUC-siRNA-Duplex und nicht auf die unterschiedlichen Konstrukte. Die abgebildeten Fluoromodifikationen dienen der Veranschaulichung und entsprechen nicht der tatsächlichen Anzahl an Modifikationen. F = 2'-Fluoro-Nukleotid, AEA = Anandamid, TPP = Tetraphenylporphyrin.

Da AEA-TPP-LUC-siRNA hauptsächlich für eine optimale Aufnahme designt wurde, sollte durch diese Studie der Einfluss der Verzweigung auf die Aktivität der siRNA untersucht werden. Es war nicht auszuschließen, dass der *RISC* dieses Konstrukt nicht länger als Substrat erkennen bzw. tolerieren würde. Als Referenz der Effektivität dienten bei dieser Studie die entsprechenden AEA-modifizierten Duplexe, welche ebenfalls mit jetPRIME transfiziert wurden. Abbildung 4.20 zeigt die Resultate dieser Studie. Dabei wird deutlich, dass die verzweigte Struktur TPP-LUC-siRNA eine Regulation der *Renilla*-Luciferase bewirkte und somit weiterhin ein Substrat für den *RISC* darstellte. Allerdings besaß die verzweigte Struktur eine geringere Effektivität als die einfachen Duplexe. Diese reduzierte Effektivität lässt sich durch eine verminderte Aktivität aufgrund der Verzweigung interpretieren. Die zusätzliche AEA-Modifikation an jedem *antisense*-Strang im Fall von AEA-TPP-LUC-siRNA beeinträchtigte die Aktivität nur in geringem Ausmaß.

Nachdem die jetPRIME-Transfektion gezeigt hatte, dass AEA-TPP-LUC-siRNA weiterhin ein Substrat für den *RISC* darstellte, wurde das Konstrukt im nächsten Schritt ohne Transfektionsreagenz zu den Zellen gegeben. Neben AEA-TPP-LUC-siRNA wurde bei dieser Studie auch das unmodifizierte Konstrukt TPP-LUC-siRNA als Kontrolle eingesetzt. Dadurch sollte untersucht werden, ob das Konstrukt bereits durch die Anwesenheit des hydrophoben Porphyrins in die Zellen diffundieren würde. Wie schon im Fall der jetPRIME-Transfektion dienten auch hier die entsprechenden AEA-modifizierten Duplexe als Referenz der detektierten RNA-Interferenz. Die Resultate dieser Studie sind in Abbildung 4.21 dargestellt.

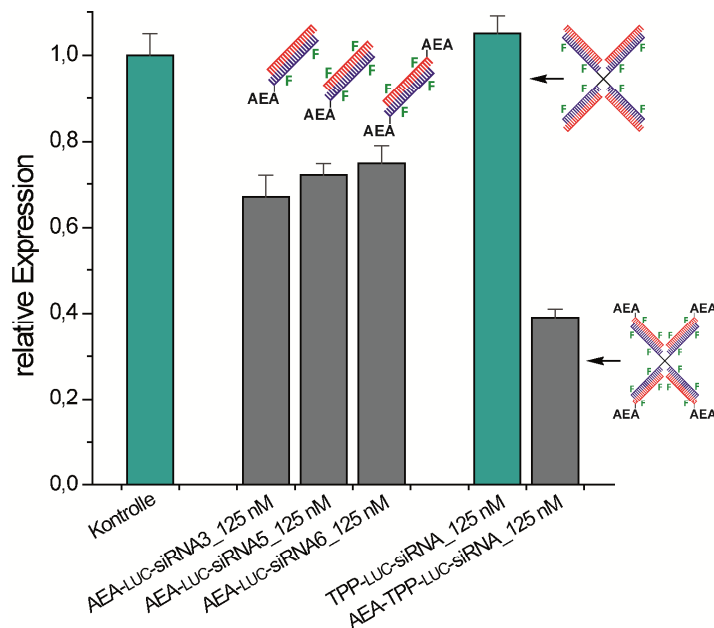


Abbildung 4.21: Einfluss der Verzweigung von AEA-TPP-LUC-siRNA auf die Aufnahme und die Effektivität der siRNA bei AEA-vermittelter Aufnahme. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf den LUC-siRNA-Duplex und nicht auf die unterschiedlichen Konstrukte. Die abgebildeten Fluoromodifikationen dienen der Veranschaulichung und entsprechen nicht der tatsächlichen Anzahl an Modifikationen. F = 2'-Fluoro-Nukleotid, AEA = Anandamid, TPP = Tetraphenylporphyrin.

Die Zugabe des unmodifizierten Konstrukts TPP-LUC-siRNA zu den Zellen bewirkte keinerlei Reduktion der *Renilla*-Luciferase Expression. Die alleinige Anwesenheit des hydrophoben Porphyrins ermöglicht somit keine unspezifische Aufnahme der verzweigten Struktur in die Zellen. Im Fall des vierfach AEA-modifizierten AEA-TPP-LUC-siRNA konnte hingegen eine deutliche Reduktion der *Renilla*-Luciferase Expression detektiert werden und belegte damit die erfolgreiche AEA-vermittelte Aufnahme des Kon-

strukts. Die Effektivität der verzweigten Struktur war dabei doppelt so hoch wie Effektivität der AEA-modifizierten Duplexe. Dabei kann die gesteigerte Effektivität einer erhöhten Aufnahme zugeordnet werden, da AEA-TPP-LUC-siRNA bei gleichmäßiger Aufnahme im Fall der jetPRIME-Transfektion eine geringere Aktivität gegenüber dem einfachen Duplex nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4.20). Die erhöhte Aufnahme lässt sich damit begründen, dass die verzweigte Struktur pro AEA-vermittelter Aufnahme den Transport von vier siRNAs in die Zelle ermöglicht, wohingegen beim einfachen Duplex pro AEA-vermittelter Aufnahme nur eine siRNA in die Zelle transportiert werden kann.

4.5.2 Regulation mit unterschiedlich verzweigter Luciferase-siRNA

Nachdem AEA-TPP-LUC-siRNA eine erhöhte Effektivität zugeordnet werden konnte, wurde im nächsten Schritt die Regulation der *Renilla*-Luciferase durch die verzweigte Struktur AEA-Tri-LUC-siRNA analysiert. Um die beiden verzweigten Strukturen auch mit den bisherigen Ergebnissen der modifizierten Duplexe vergleichen zu können, wurden neben AEA-Tri-LUC-siRNA und AEA-TPP-LUC-siRNA ebenfalls AEA-siRNA und Chol-siRNA zu den Zellen gegeben. Die Resultate dieser Studie sind in Abbildung 4.22 dargestellt.

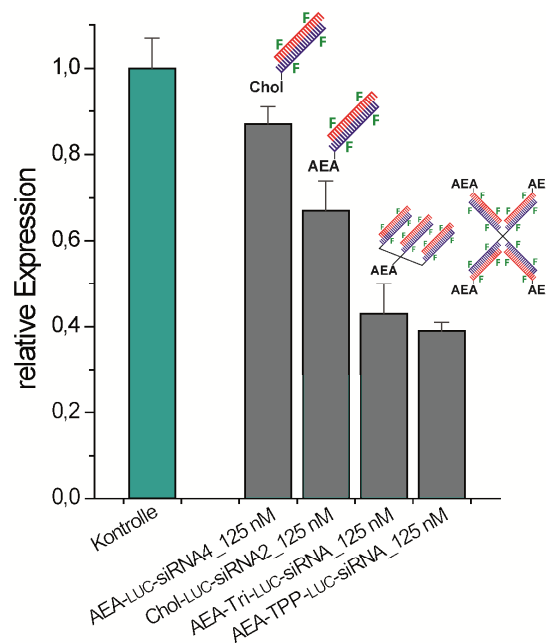


Abbildung 4.22: Vergleich der Regulations-Effektivität der beiden verzweigten Strukturen AEA-Tri-LUC-siRNA und AEA-TPP-LUC-siRNA gegenüber dem AEA- bzw. Chol-modifizierten siRNA-Duplex. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf den LUC-siRNA-Duplex und nicht auf die unterschiedlichen Konstrukte. Die abgebildeten Fluoromodifikationen dienen der Veranschaulichung und entsprechen nicht der tatsächlichen Anzahl an Modifikationen. F = 2'-Fluoro-Nukleotid, AEA = Anandamid, Chol = Cholesterol, TPP = Tetraphenylporphyrin.

In Bezug auf die einfachen Duplexe AEA-siRNA und Chol-siRNA bewirkten die beiden verzweigten Strukturen bei der gewählten siRNA-Konzentration eine klare Steigerung der RNA-Interferenz. Das einfache AEA-modifizierte Konstrukt AEA-Tri-LUC-siRNA erreichte im Rahmen dieser Studie nahezu die gleiche Regulation der *Renilla*-Luciferase wie das vierfach AEA-modifizierte Konstrukt. Demnach führte die reduzierte Anzahl an AEA-Modifikationen aufgrund der anisotropen Struktur zu keiner übermäßigen Beeinträchtigung der Interaktionsmöglichkeit mit dem Cannabinoidrezeptor bzw. dem

Transportsystem. Die vergleichbare Effektivität gegenüber AEA-TPP-LUC-siRNA trotz der geringeren Anzahl an siRNA-Duplexen lässt sich zum Einen durch eine verbesserte Aufnahme aufgrund der kompakteren Morphologie erklären. Zum Anderen könnte AEA-Tri-LUC-siRNA ein besseres Substrat für den *RISC* darstellen.

Wie in Kapitel 4.3 aufgeführt, konnte die Regulations-Fähigkeit der einfachen Duplexe AEA-siRNA und Chol-siRNA ab einer gewissen Konzentration nicht weiter gesteigert werden, was letztendlich zu Konstruktion der verzweigten Strukturen führte. Im nächsten Schritt galt es daher zu untersuchen, ob sich mit Hilfe dieser Strukturen die maximale Regulation der *Renilla*-Luciferase weiter steigern ließe. Zu diesem Zweck wurde die Studie bei unterschiedlichen Konzentrationen wiederholt. Die Resultate dieser Experimente sind in Abbildung 4.23 dargestellt.

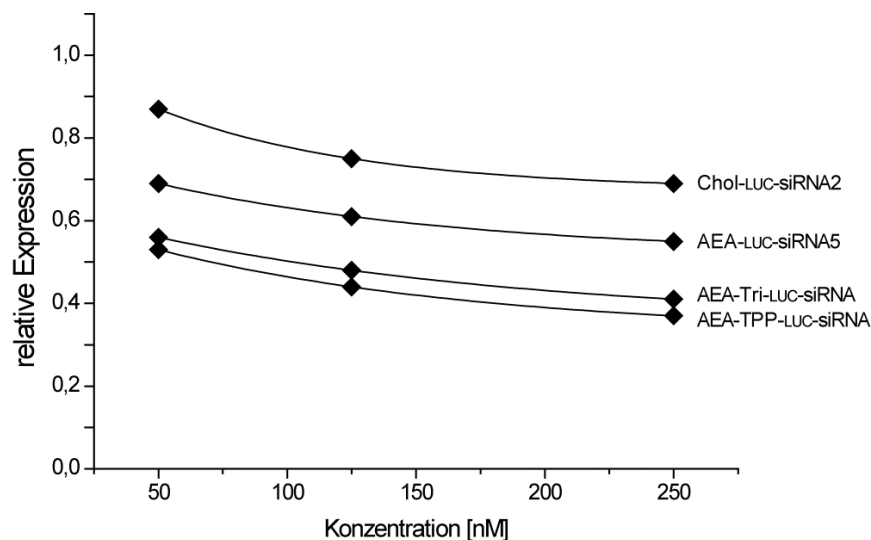


Abbildung 4.23: Regulations-Fähigkeit der unterschiedlichen Konstrukte in Abhängigkeit der Konzentration. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf den LUC-siRNA-Duplex und nicht auf die unterschiedlichen Konstrukte. AEA = Anandamid, Chol = Cholesterol, TPP = Tetraphenylporphyrin.

Durch die verzweigten Strukturen AEA-TPP-LUC-siRNA und AEA-Tri-LUC-siRNA konnte das Sättigungsniveau der RNA-Interferenz wie erhofft deutlich abgesenkt werden. Dies bestätigte die aufgestellte These, dass sich die maximale Kapazität des Transportsystems durch die Verwendung verzweigter siRNA-Strukturen erhöhen lässt, da hier pro AEA-vermittelter Aufnahme mehrere siRNAs in die Zelle transportiert werden. Da AEA-Tri-LUC-siRNA trotz einer geringeren Anzahl an siRNA nahezu die gleiche Regulation wie AEA-TPP-LUC-siRNA bewirkte, kann dieser verzweigten Struktur eindeutig das größere Potential zugeordnet werden.

4.5.3 Regulation bei zusätzlicher Glucose-Modifikation

Im finalen Schritt wurde versucht, die Effektivität der siRNA durch deren Glycosylierung zu erhöhen und damit die Regulation der *Renilla*-Expression weiter zu steigern. Die Resultate dieser Studie sind in Abbildung 4.24 dargestellt.

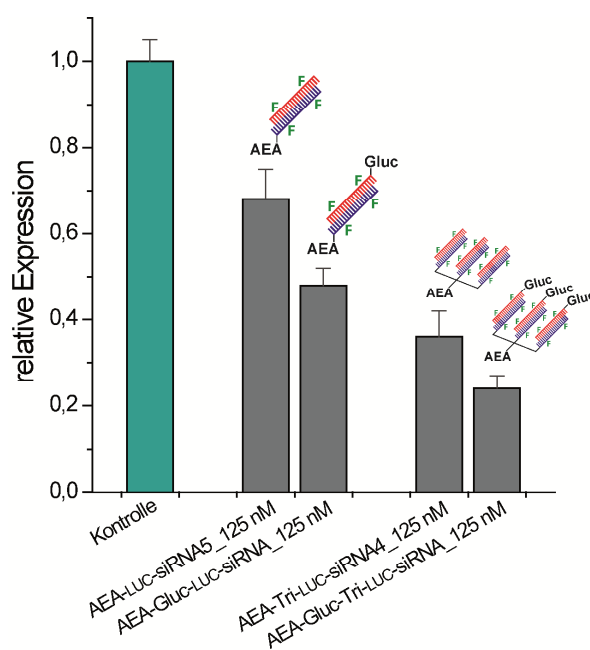


Abbildung 4.24: Einfluss der endständigen Glycosylierung der siRNA auf deren Effektivität. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf den LUC-siRNA-Duplex und nicht auf die unterschiedlichen Konstrukte. Die abgebildeten Fluoromodifikationen dienen der Veranschaulichung und entsprechen nicht der tatsächlichen Anzahl an Modifikationen. AEA = Anandamid, Gluc = Glucose.

Die Glycosylierung führte sowohl im Falle des einfachen Duplexes AEA-Gluc-LUC-siRNA, als auch im Fall der verzweigten Struktur AEA-Gluc-Tri-LUC-siRNA zu einer erhöhten Regulation der *Renilla*-Luciferase. Neben der reinen Stabilisierung könnte sich die Glycosylierung dabei positiv auf die Aufnahme der AEA-modifizierten siRNA ausgewirkt haben. So könnte die glycosylierte siRNA mit Zuckerbindenden Membranproteinen (Lektinen) auf der Zelloberfläche wechselwirken und dadurch die Aufenthaltswahrscheinlichkeit der siRNA an der Zelloberfläche erhöhen.^[109-110] Dies würde die Interaktion der AEA-Modifikation mit dem Cannabinoidrezeptor bzw. dem Transportsystem fördern. Eine Interaktion mit Glucosetransportern der GLUT-Familie ist ebenfalls nicht auszuschließen. Diese Transporter sind auf allen Zelloberflächen vorhanden^[238] und werden in zahlreichen Krebsarten aufgrund des erhöhten Glucosebedarfs stark überexprimiert.^[239]

Letztendlich führte die verzweigte Struktur AEA-Gluc-Tri-LUC-siRNA in Kombination mit der Glycosylierung zu einer Reduktion der *Renilla*-Luciferase Expression um 76 %. In dieser Studie entspricht das einer nahezu 2.5-fachen Steigerung der Regulations-Fähigkeit gegenüber dem ausschließlich AEA-modifizierten Duplex. Die maximale Kapazität des Transportsystems konnte somit eindrucksvoll überwunden werden und führte zu einer effektiven Stilllegung der *Renilla*-Luciferase Expression.

5 Regulation eines endogenen Gens durch Ananda- mid-modifizierte siRNA

In Kapitel 3 konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die AEA-vermittelte Aufnahme von siRNA die effektive Regulation einer *Renilla* Luciferase innerhalb der Immunzellen RBL-2H3 bewirkte. Hierbei handelte es sich allerdings um ein artifizielles System, welches über eine Plasmid-Transfektion in die RBL-2H3 Zellen implementiert wurde. Folglich sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob sich die erhaltenen Resultate ebenfalls auf ein endogenes Gen übertragen lassen würden. In Hinblick auf potentielle Anwendungen wurde dafür ein therapeutisch relevantes Enzym innerhalb des Immunsystems gewählt.

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei RBL-2H3 Zellen um Mastzellen^[211] mit zentraler Bedeutung innerhalb des Immunsystems.^[8] In diesem Zusammenhang dienen RBL-2H3 Zellen in zahlreichen Studien als Modellsystem, um die Ausschüttung entzündlicher Botenstoffe durch die Stimulation von Mastzellen zu untersuchen.^[240] Die Signalkaskade dieser Ausschüttung wurde als Ansatzpunkt gewählt, um die Regulation eines endogenen Gens durch die AEA-vermittelte Aufnahme von siRNA zu zeigen. Im folgenden Abschnitt wird diese Antigen-induzierte Signalkaskade detailliert beschrieben. Im Anschluss daran wird die Synthese AEA-modifizierter siRNA zur Regulation eines zentralen Enzyms innerhalb dieser Kaskade vorgestellt. Das Kapitel schließt mit der Regulation dieses Enzyms durch die AEA-vermittelte Aufnahme der synthetisierten siRNA.

5.1 Antigen-induzierte Stimulation von Mastzellen

Mastzellen sind multifunktionale Immunzellen und spielen eine wichtige Rolle bei Allergien, Überempfindlichkeit und Entzündungen.^[8] Die Stimulation von Mastzellen durch Antigene führt zu einer sogenannten Degranulation. Hierbei verschmelzen in der Zelle vorhandene Vesikel (Granula) mit der Zellmembran, wodurch Botenstoffe wie Histamin, Proteasen, chemotaktische Faktoren und Zytokine freigesetzt werden.^[241] Diese Botenstoffe haben entzündliche Reaktionen wie Gewebeschwellung, Rekrutierung von Leukozyten, Schmerz und Funktionsverlust zur Folge und gelten als Ursache von Autoimmunerkrankungen.^[242] Mastzellen sind daher ein wirkungsvoller Ansatzpunkt zur Behandlung und Kontrolle von allergischen Krankheiten^[243] und Autoimmunerkrankungen.^[242]

Die Aktivierung von Mastzellen durch ein Antigen erfolgt durch Bindung an den FcεRI-Rezeptorkomplex über Immunglobulin E an der Zelloberfläche. Dadurch wird eine Signalkaskade ausgelöst, was letztendlich zur Ausschüttung von Histamin und der Produktion von Zytokinen führt.^[244] Ein Ausschnitt dieser Kaskade ist schematisch in Abbildung 5.1 dargestellt. Von zentraler Bedeutung innerhalb dieser Kaskade ist die Protein Tyrosin Kinase SYK, welche nach Aktivierung des FcεRI-Rezeptorkomplexes aus dem Cytoplasma rekrutiert wird.^[10] Wie in Abbildung 5.1 aufgeführt, sind neben der Kinase SYK eine Vielzahl weiterer Kinasen an der Signaltransduktion beteiligt. Allerdings führt nur die Abwesenheit der Kinase SYK zu einer vollständigen Unterdrückung der Degranulation von Mastzellen.^[245] Die zentrale Bedeutung innerhalb der Signalkaskade weist der Kinase SYK einen vielverspre-

chenden Ansatzpunkt für die therapeutische Behandlung von allergischen oder entzündlichen Funktionsstörungen zu.^[10, 246] So konnte bereits *Sanderson* zeigen, dass die Regulation der Kinase SYK durch siRNA eine effektive Unterdrückung der Degranulation von RBL-2H3 Zellen bewirkte.^[247] Auf der Basis dieser Ergebnisse wurde versucht, die Kinase SYK durch die AEA-vermittelte Aufnahme von siRNA ebenfalls zu regulieren.

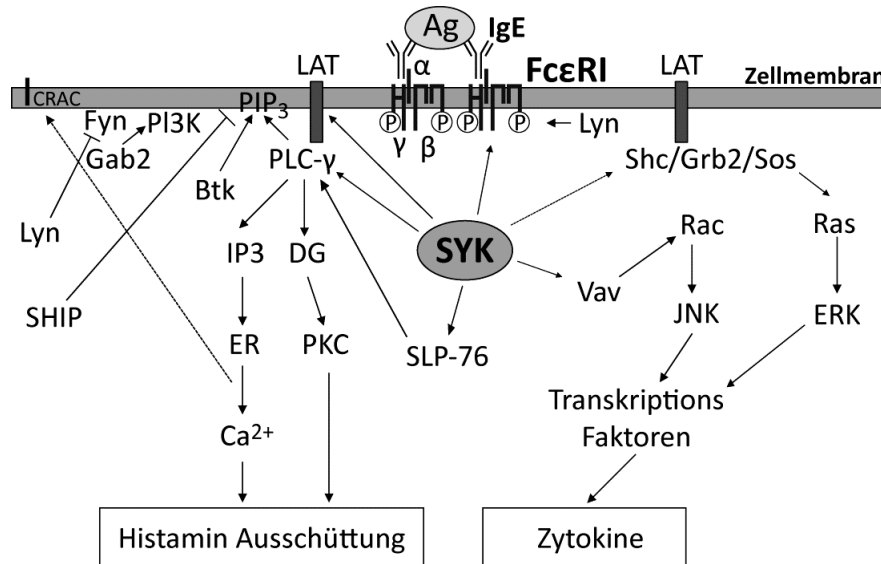


Abbildung 5.1: FcεRI-vermittelte Signalkaskade in Mastzellen durch Antigen-Aktivierung. Von zentraler Bedeutung innerhalb dieser Kaskade ist die Protein Tyrosin Kinase SYK. Die Kaskade wird aktiviert durch Interaktion eines Antigens (Ag) mit Immunglobulin E (IgE), welches an der α-Kette des hochaffinen IgE-Rezeptors FcεRI gebunden vorliegt. Dies führt zu einer Phosphorylierung (P) der β- und γ-Einheit des FcεRI-Rezeptors durch die Protein Tyrosin Kinase Lyn. Durch diese Phosphorylierung wird die Protein Tyrosin Kinase SYK im Cytoplasma rekrutiert, welche über ihre beiden SH2-Domänen an die γ-Einheit des FcεRI bindet. Diese Bindung bewirkt eine Konformationsänderung und damit eine Aktivierung der Kinase SYK, welche anschließend die Proteine LAT, PLC-γ, SLP-76, Vav, Shc, Grb2 und Sos phosphoryliert. Die Phosphorylierung von PLC-γ bewirkt die Freisetzung von Ca²⁺-Ionen und die Aktivierung der Protein Kinase PKC, was letztendlich zur Ausschüttung von Histamin führt. Durch Vav, Shc, Grb2 und Sos werden die GTPasen Rac und Ras stimuliert. Diese beiden GTPasen aktivieren die Kinasen ERK und JNK, was letztendlich die Synthese von Zytokinen zur Folge hat.

5.2 Synthese modifizierter SYK-Kinase siRNA

Der folgende Abschnitt beschreibt die Synthese AEA-modifizierter siRNA zur selektiven Regulation der Protein Kinase SYK. Wie schon im Fall der Luciferase-siRNA, gliedert sich deren Synthese in RNA-Festphasensynthese, postsynthetische Click-Modifikation und anschließende Hybridisierung. Die verwendete Sequenz der SYK-siRNA wurde von *Sanderson* übernommen.^[247] *Sanderson* hatte zehn verschiedene SYK-siRNA Sequenzen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit in RBL-2H3 Zellen untersucht. Die Effektivität der Regulation wurde dabei anhand des mRNA-Levels der Kinase SYK und der Degranulation der Zellen eingeordnet. Im Rahmen dieser Studie erwies sich eine Sequenz hinsichtlich beider Kriterien als besonders effektiv und löste darüber hinaus keinerlei Interferon-Antwort der Zellen aus. Diese Sequenz wurde folglich für die hier angestrebten RNA-Interferenz Studien übernommen. Abbildung 5.2 zeigt rot hervorgehoben den komplementären Sequenzabschnitt dieser siRNA innerhalb der mRNA der Kinase SYK sowie die daraus resultierende SYK-siRNA. Die Festphasensynthese der SYK-siRNA erfolgte wie im Fall der LUC-siRNA unter Verwendung von 2'-Thiomorpholin-4-carbothioat RNA-Phosphoramiditen (TC RNA-Synthese) auf dT-CPG Trägermaterial.

mRNA-Sequenzabschnitt der Protein Tyrosin Kinase SYK*rattus norvegicus* (5317 BP, NM_012758.1)

```

391  GGCCGAAGAC  TACCTGGTCC  AGGGAGGCAT  GACCGATGGG  CTCTACCTGC
441  TACGCCAGAG  CCGCAATTAC  CTGGGTGGTT  TTGCTTTGTC  GGTGGCACAC
491  AACAGGAAGG  CACACCACTA  CACTATCGAG  AGAGAACTTA  ACGGCACCTA
481  CGCCATCTCC  GGGGGCAGGG  CCCATGCCAG  CCCGGCAGAC  CTCTGCCATT
531  ACCACTCCCA  GGAACCCGAA  GGCCTGGTCT  GCCTCCTCAA  GAAGCCCTTC

```

Gen	5'	CCA CTA CAC TAT CGA GAG A	
mRNA	5'	CCA CUA CAC UAU CGA GAG A	
SYK-siRNA	5'	CCA CUA CAC UAU CGA GAG ATT	<i>sense</i>
	3'	TT GGU GAU GUG AUA GCU CUC U	<i>antisense</i>

Abbildung 5.2: mRNA-Sequenzabschnitt 391 bis 580 der Protein Tyrosin Kinase SYK der Spezies *Rattus norvegicus*. Die komplementäre Sequenz der SYK-siRNA beginnend an Position 505 wurde rot hervorgehoben. Die resultierende SYK-siRNA zur selektiven Regulation der Protein Tyrosin Kinase SYK ist darunter aufgeführt.

Zur anschließenden postsynthetischen Click-Modifikation wurde sowohl der *sense*-, als auch der *antisense*-Strang an der zweiten Position des 3'-Überhangs durch den Einbau des 2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridinphosphoramidits **7** mit einem Alkin funktionalisiert. Zusätzlich zu den Standard-Nukleosiden dienten 2'-Fluoro-Nukleoside zur Erhöhung der Stabilität und der Nuklease-Resistenz.^[64, 69] Die Modifikation erfolgte analog zur LUC-siRNA durch 2'-Fluoro-Uridin und 2'-Fluoro-Cytidin unter Berücksichtigung der labilen Sequenzmotive *UA/UA* und *CA/UG*.^[221] Da sich in Kap. 3 die Modifikation des *antisense*-Strangs tendenziell negativ auf die Effektivität der LUC-siRNA ausgewirkt hatte, wurde hier auf eine Modifikation des *antisense*-Strangs durch 2'-Fluoro-Nukleoside verzichtet. Die synthetisierten Stränge SYK-*sense* ORN13 und SYK-*antisense* ORN14 mit den zugehörigen Sequenzen sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Bezeichnung	Strang	Sequenz 5' → 3'
SYK-sense	ORN13	<u>CCA</u> - <u>CUA</u> -CAC- <u>UAU</u> -CGA-GAG-A <u>XT</u>
SYK-antisense	ORN14	UCU-CUC-GAU-AGU-GUA-GUG-G <u>XT</u>

Tabelle 5.1: Synthetisierter *sense*- und *antisense*-Strang der SYK-siRNA mit den zugehörigen Sequenzen unter Verwendung des 2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridinphosphoramidits **7**. *N* = Desoxynukleosid, *N* = 2'-Fluoronukleosid, *X* = 2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridin.

5.2.1 Modifizierte SYK-Kinase siRNA

Nach abgeschlossener Festphasensynthese wurden der *sense*-Strang ORN13 durch die Azide Anandamid-Azid **5** (AEA-Azid) und Cholesterol-Azid **23** (Chol-Azid) mittels Click-Reaktion modifiziert und mit dem kommerziell erworbenen *antisense*-Strang ORN15 hybridisiert. Neben diesen beiden Duplexen Chol-SYK-siRNA und AEA-SYK-siRNA wurde ebenfalls die verzweigte Struktur mit endständiger Glucose-Modifizierung AEA-Gluc-Tri-SYK-siRNA konstruiert. Hierfür wurde im ersten Schritt der *antisense*-Strang ORN14 mit Hilfe des Glucose-Azids **39** glycosyliert. In einem zweiten Schritt wurde das AEA-Triazid **33** äquimolar mit dem *sense*-Strang ORN13 zur entsprechenden verzweigten Struktur verbunden. Durch Hybridisierung der beiden Click-Produkte wurde schließlich die verzweigte siRNA-Struktur

AEA-Gluc-Tri-SYK-siRNA ausgebildet. Tabelle 4.6 fasst die modifizierten siRNA-Duplexe sowie die verzweigte siRNA zusammen.

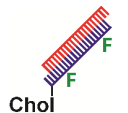

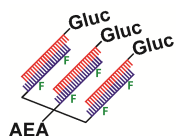
Bezeichnung	Strang	Sequenz (sense / antisense)	Struktur
Chol-SYK-siRNA	ORN13+23 ORN15	5' - <u>C</u> CA-C <u>U</u> A-CAC- <u>U</u> AU-CGA-GAG-A <u>X</u> T +23 3' - TTGGU-GAU-GUG-AUA-GCU-CUC-U	
AEA-SYK-siRNA	ORN13+5 ORN15	5' - <u>C</u> CA-C <u>U</u> A-CAC- <u>U</u> AU-CGA-GAG-A <u>X</u> T +5 3' - TTGGU-GAU-GUG-AUA-GCU-CUC-U	
AEA-Gluc-Tri-SYK-siRNA	33+(ORN13) ₃ ORN14+39	5' - <u>C</u> CA-C <u>U</u> A-CAC- <u>U</u> AU-CGA-GAG-A <u>X</u> T +33 3' - T <u>X</u> GGU-GAU-GUG-AUA-GCU-CUC-U +39	

Tabelle 5.2: Modifizierte SYK-siRNAs mit den zugehörigen Sequenzen. Die Liganden-Modifikation der siRNA erfolgte durch Cycloaddition der entsprechenden Azide an das Alkinnukleosid X des jeweiligen Einzelstrangs. N = Desoxyribonukleosid, N = Ribonukleosid, N = 2'-Fluoronukleosid, X = 2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridin. AEA = Anandamid, Chol = Cholesterol, Gluc = Glucose.

5.3 Regulation der Kinase SYK durch modifizierte siRNA

Zur Regulation der Kinase SYK wurden die adhärenenten RBL-2H3 Zellen in 6-well Platten inkubiert und anschließend mit der entsprechenden SYK-siRNA versetzt. Die Effektivität der Regulation wurde analog zu den Studien in Kapitel 3 mit einem zeitlichen Versatz von 48 Stunden quantifiziert. Da sich das Expressions-Niveau der Kinase SYK nicht wie im Fall der Luciferase durch Zugabe eines selektiven Substrates bestimmen ließ, wurde dieses anhand des mRNA-Levels mittels quantitativer *realtime* PCR bestimmt. Durch die Betrachtung des mRNA-Levels spiegelt diese äußerst sensitive Quantifizierungsmethode die direkte Wirkung der siRNA wider und eignet sich daher hervorragend zur Interpretation der RNA-Interferenz.

Um die absoluten mRNA-Level der einzelnen Experimente miteinander vergleichen zu können, wurden diese, wie schon die Expression der *Renilla* Luciferase, durch einen internen Standard normalisiert. Analog zu Sanderson^[247] wurde zu diesem Zweck das absolute mRNA-Level der Kinase SYK stets im Verhältnis zum mRNA-Level der Polymerase II betrachtet. Bei dieser Polymerase handelt es sich um ein nicht-reguliertes Gen (*housekeeping gene*), d.h. es weist ein konstantes mRNA-Level unabhängig von Zellzyklus oder externen Einflüssen auf. Diese konstante Expression kann als zellinterner mRNA-Standard verwendet werden. Als Referenzpunkt der RNA-Interferenz diente das mRNA-Level der Kinase SYK in Abwesenheit der siRNA. In erster Instanz wurde die AEA-SYK-siRNA als Positivkontrolle mit Hilfe des Transfektionsreagenzes jetPRIME transfiziert. Dadurch sollte gezeigt werden, dass die verwendete siRNA tatsächlich zur Regulation der Kinase SYK fähig war. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit *nonsense*-siRNA transfiziert. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass die beobachtete Regulation tatsächlich sequenzspezifisch durch die verwendete SYK-siRNA erfolgte.

Neben diesen Kontrollen wurde die synthetisierte AEA-SYK-siRNA sowie die verzweigte siRNA-Struktur AEA-Gluc-Tri-SYK-siRNA ohne jetPRIME zu den Zellen gegeben. Die Zuordnung der Effektivität erfolgte dabei wie schon im Fall der Luciferase durch Cholesterol-modifizierte siRNA. Die Resultate dieser Studie sind in Abbildung 5.3 dargestellt.

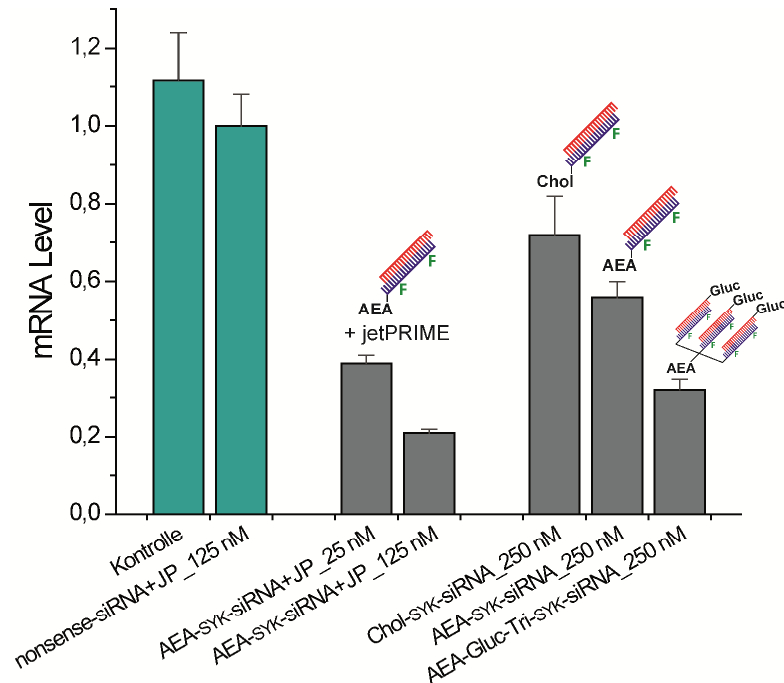


Abbildung 5.3: Regulation der Protein Tyrosin Kinase SYK durch modifizierte SYK-siRNA. Die Effektivität der Regulation bezieht sich auf das relative mRNA-Level der Kinase SYK und wurde durch quantitative *realtime* PCR bestimmt. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich jeweils auf den SYK-siRNA-Duplex. Die abgebildeten Fluoromodifikationen dienen der Veranschaulichung und entsprechen nicht der tatsächlichen Anzahl an Modifikationen. F = 2'-Fluoro-Nukleotid, AEA = Anandamid, Chol = Cholesterol, Gluc = Glucose.

Wie in Abbildung 5.3 ersichtlich, bewirkte bereits die Transfektion der Zellen mit *nonsense*-siRNA eine geringfügige Absenkung des mRNA-Levels der Kinase SYK. Um diesen unspezifischen Regulationseffekt zu berücksichtigen, wurde fortan das mRNA-Level in Anwesenheit der *nonsense*-siRNA als Referenzpunkt der RNA-Interferenz verwendet. Die jetPRIME-Transfektion der AEA-siRNA bewirkte eine effektive und konzentrationsabhängige Reduktion des mRNA-Levels der Kinase SYK und bestätigte damit die Wirksamkeit der von Sanderson^[247] vorgeschlagenen SYK-siRNA. Die Zugabe der modifizierten Duplexe Chol-siRNA und AEA-siRNA ohne jetPRIME bewirkte ebenfalls eine Reduktion des mRNA-Levels der Kinase SYK. Dadurch konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die AEA-vermittelte Aufnahme der siRNA zur Regulation eines endogenen Gens in Immunzellen führte. Der Trend und die Effektivität der Regulation der Kinase SYK waren dabei nahezu identisch zur Regulation der *Renilla* Luciferase in Kap. 3. Auch hier erwies sich AEA-siRNA effektiver als Chol-siRNA und erzielte eine Regulation von ca. 40 %. Aufgrund dieser Übereinstimmung kann davon ausgegangen werden, dass das Duale Luciferase Reportersystem ein valides Modell der endogenen Gen-Expression darstellt und die in Kap. 3 gewonnenen Resultate prinzipiell auf jedes Gen übertragbar sein sollten.

Ebenfalls analog zu den Ergebnissen in Kap. 3 konnte die Effektivität der Regulation durch den Einsatz der verzweigten und glycosylierten Struktur AEA-Gluc-Tri-syk-siRNA deutlich gesteigert werden. Diese gesteigerte Effektivität bewirkte eine Reduktion des mRNA-Levels der Kinase SYK um ca. 70 % und erreichte damit ein vergleichbares Niveau wie die jetPRIME-transfizierte siRNA. Bezogen auf die Chol-modifizierte siRNA entspricht dies einer 2.4-fachen Steigerung der Effektivität, wodurch erneut das große Potential dieser verzweigten Struktur deutlich wird.

Zusammenfassend konnte erstmals gezeigt werden, dass durch die AEA-vermittelte Aufnahme von siRNA ein endogenes Gen in Immunzellen effektiv reguliert werden konnte. Dabei erwies sich die AEA-modifizierte siRNA effektiver als die Cholesterol-modifizierte siRNA. Die Effektivität der Regulation konnte durch die verzweigte und glycosylierte Struktur AEA-Gluc-Tri-syk-siRNA deutlich gesteigert werden und war dadurch vergleichbar zu jetPRIME-transfizierter siRNA.

6 Ausblick

In dieser Arbeit konnte erstmals die erfolgreiche Regulation eines endogenen Gens durch die AEA-vermittelte Aufnahme von siRNA innerhalb der Mastzellen RBL-2H3 gezeigt werden. Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob sich damit weitere Cannabinoidrezeptor-positive Zellen adressieren lassen. Neben weiteren Immunzellen sollten hierbei auch neuronale Zellen untersucht werden. Um eine validere Aussage für therapeutische Anwendungen treffen zu können, sollte man dabei generell auf humane Zelllinien zurückgreifen. In diesem Zusammenhang müsste die Spezifität der Aufnahme genauer untersucht werden. Hierfür müsste man einerseits kompetitive Aufnahmestudien mit geeigneten Inhibitoren durchführen. Andererseits sollte die Spezifität an Cannabinoidrezeptor-negativen Zellen analysiert werden. Für eine aussagekräftige Interpretation müsste hier die Abwesenheit der Rezeptoren über einen entsprechenden Antikörper experimentell bestätigt werden.

Da eine erhöhte Anzahl an siRNA-Duplexen pro AEA-Modifikation zu einer gesteigerten RNA-Interferenz führte, sollte dieses Konzept erweitert werden. Dabei sollte die Anzahl an siRNA-Duplexen pro AEA-Modifikation schrittweise angehoben werden. Als Grundgerüst für diese Untersuchungen erscheint das Konstrukt AEA-Tri-siRNA ein geeigneter Kandidat, da es sich bereits experimentell bewährt hat. Zur Erweiterung dieser Struktur sollte ein Baustein gewählt werden, welcher eine divergente Synthese dendritischer Moleküle ermöglicht. Mit Hilfe dieses Bausteins könnte man das System beliebig ausdehnen. Eine Verlängerung des Linkers zwischen dem Azid und der Verzweigungsstelle könnte sich dabei positiv auf die Akzeptanz durch den *RISC* auswirken. Neben der Vergrößerung der verzweigten Struktur sollte untersucht werden, ob sich das Konzept der gesteigerten Aufnahme auch auf andere Liganden-Konjugate übertragen lässt. In diesem Zusammenhang sollte eingehender analysiert werden, ob durch die Verwendung der verzweigten Strukturen tatsächlich mehr siRNA-Duplexe in die Zelle transportiert werden. Die gesteigerte Aufnahme ließe sich u.a. mittels Durchflusszytometrie in Verbindung mit Farbstoff-Markierung der verzweigten Struktur experimentell bestätigen.

Die zusätzliche Modifikation der AEA-siRNA an der 3'-Position des *antisense*-Strangs könnte deren Effektivität und Anwendbarkeit in vielerlei Hinsicht steigern. Dabei sollte der positive Einfluss der 3'-Glycosylierung intensiver untersucht werden. Wie in Kap. 3.5.3 diskutiert, wäre neben der Stabilisierung und der Erhöhung der Aufenthaltswahrscheinlichkeit der siRNA an der Zelloberfläche ebenfalls eine Interaktion mit Glucose-Transportern der GLUT-Familie möglich. Obwohl diese Transporter in HeLa Zellen nicht zur Aufnahme von Glucose-modifizierter siRNA fähig waren (siehe Kap. 1.3.1), ist eine Aufnahme in RBL-2H3 Zellen nicht gänzlich auszuschließen. Neben Glucose sollte die AEA-siRNA durch weitere funktionale Moleküle an der 3'-Position des *antisense*-Strangs modifiziert werden. Dabei könnten Modifikationen mit endosomolytischen Funktionalitäten die intrazelluläre Verfügbarkeit der siRNA steigern. So ließe sich durch Amine der Protonenschwamm-Effekt nutzen, um innerhalb der Zelle dem Endosom zu entweichen. Diese sollten allerdings durch säurelabile Schutzgruppen maskiert werden, um die Spezifität der AEA-siRNA weiter aufrecht zu erhalten.

Die Resistenz der siRNA gegenüber 3'-Exonukleasen ließe sich eventuell durch sperrige Modifikationen an der 3'-Position des *antisense*-Strangs weiter steigern. Hierbei sollte jedoch stets der Einfluss auf die Akzeptanz durch den *RISC* bedacht werden. Allerdings könnten sich sperrige Modifikationen als nützlich für künftige Anwendungen *in vivo* erweisen. Dabei würde die Vergrößerung der verzweigten siRNA-Struktur deren pharmakokinetische Eigenschaften verbessern, indem die frühzeitige Ausscheidung durch Nierenfiltration unterdrückt wird.

Nach Abschluss der Optimierung sollte die AEA-siRNA zur Regulation eines Gens *in vivo* eingesetzt werden. Hierfür würde sich speziell eine Anwendung innerhalb des Immunsystems eignen, da Cannabinoiden immunsuppressive und entzündungshemmende Eigenschaften nachgewiesen werden konnten.^[248] AEA-siRNA könnte daher als Therapeutikum mit einem dualen Wirkmechanismus dienen.

7 Experimenterteil

7.1 Materialien und Methoden

Lösungsmittel und **Chemikalien** wurden, falls nicht anders erwähnt, in der kommerziell erhältlichen Qualität *puriss p.a.* oder *purum* eingesetzt und von den Firmen *Fluka*, *Sigma Aldrich*, *Acros*, *Merck*, *Lancaster* oder *Carbosynth* bezogen. 15-Azido-14,14-bis(azidomethyl)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-1-amin (**34**) wurde von *Johannes Harder*^[222] zur Verfügung gestellt. Glucose-Azid **39** wurde von *Felix Gnerlich*^[249] zur Verfügung gestellt. **Oligonukleotide** wurden von den Firmen *Metabion* und *Eurogentech* bezogen. Bidestilliertes Wasser wurde mit einer *Milli-Q Plus* Anlage der Firma *Millipore* erzeugt. Trockene Lösungsmittel wurden von den Firmen *Fluka*, *Acros* oder *Aldrich* bezogen. Lösungsmittel für Extraktionen und Säulenchromatographie waren von technischer Qualität und wurden vor der Verwendung destilliert. Das Einengen von Lösungsmittel *in vacuo* wurde an einem Rotationsverdampfer der Firma *Heidolph* im Membranpumpenvakuum (*Vario PC2001*-Membranpumpenstand der Firma *Vacuubrand*) durchgeführt. Zur Feintrocknung *in vacuo* wurde in eine Ölvakuumpumpe *RZ-2.5* der Firma *Vacuubrand* verwendet. Kleinere Mengen an wässrigen oder Acetonitril-haltigen Lösungen wurden mit einer *SpeedVac Plus SC110A*, *SpeedVac SPD 111V* der Firma *Savant* bzw. einer *RVC 2-25* mit *2-50* oder *2-50SR* Kompressorkühlfällen der Firma *Christ* entfernt. Zur Lyophilisierung wässriger Lösungen wurde eine *Alpha 2-4 LDplus* Lyophilie der Firma *Christ* verwendet.

Säulenchromatographie wurde nach der *Flash*-Methode durchgeführt. Es wurde Kieselgel 60 (Korngröße 0.040-0.063 mm) der Firma *Merck* verwendet. Die Elution erfolgte bei Raumtemperatur unter Verwendung eines N_2 -Überdruckes. Die Angabe der eingesetzten Lösungsmittelverhältnisse erfolgte in Volumenprozent.

Dünnschichtchromatogramme wurden auf Aluminium-Fertigplatten Kieselgel-60 F_{254} der Firma *Merck* angefertigt. Die Substanzen wurden unter UV-Licht (254 nm, 366 nm) oder durch Anfärben mit den Tauchreagenzien Anisaldehyd-Lsg. (0.5 mL Anisaldehyd in 50 mL Eisessig und 1 mL konz. H_2SO_4), Cermolybdat-Lsg. (120 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot H_2O$ und 5 g $Ce(NO_3)_6$ in 800 mL 10 % H_2SO_4), $KMnO_4$ -Lsg. (0.5 %) in 1 M NaOH, Bromkresol-Lsg. (0.1 g Bromkresol, 500 mL EtOH, 5 mL 0.1 M NaOH), Ninhydrin-Lsg. (1.5 g Ninhydrin, 100 mL *n*Butanol, 3 mL Eisessig) mit anschließender Wärmebehandlung sichtbar gemacht.

1H -Kernresonanzspektren (1H -NMR) wurden bei Raumtemperatur an einem *Varian Mercury 200VX* Gerät bei 200 MHz aufgenommen. Kernresonanzspektren höherer Messfrequenzen wurden von der Kernresonanzabteilung des Departments Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität an einem *Varian 300*, *Inova 400* oder *Varian 600* aufgenommen. Die Messfrequenz in MHz sowie das Lösungsmittel wurden jeweils in Klammern vermerkt. Die chemische Verschiebung δ wurde in ppm relativ zu Tetramethylsilan (TMS) und die Kopplungskonstante J in Hz angegeben. Die Signalmultiplizitäten wurden als *s* (Singulett), *d* (Duplett), *t* (Triplett), *q* (Quartett) und *m* (Multipllett) sowie ggf. deren Kombinationen gekennzeichnet. Die Signalzuordnung wurde unter Zuhilfenahme von COSY-, HMBC- und HSQC-Spektren durchgeführt.

^{13}C -Kernresonanzspektren (^{13}C -NMR) wurden von der Kernresonanzabteilung des Departments Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität an einem *Varian 300*, *Inova 400* oder *Varian 600* aufgenommen. Die Messfrequenz in MHz sowie das Lösungsmittel wurden jeweils in Klammern vermerkt. Die chemische Verschiebung δ wurde in ppm relativ zu Tetramethylsilan (TMS) angegeben. Die Signalzuordnung erfolgte mittels HMBC- und HSQC-Spektren.

Infrarotspektren (IR) wurden auf einem *Perkin-Elmer FT-IR Spectrum 100*-Spektrometer aufgenommen, welches mit einer ATR-Einheit (Totalreflexionsverfahren) ausgestattet war. Die relativen Intensitäten sind mit den Symbolen *s* (stark), *m* (mittel), *w* (schwach), gekennzeichnet.

Massenspektren (MS) wurden von der Abteilung Massenspektrometrie des Departments Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München an *Varian MAT CH 7A* (Elektronenstoßionisation EI, 70 eV) und *Thermo Finnigan LTQ FT* (Elektronensprayionisation, ESI) Geräten aufgenommen. MALDI-Massenspektrometrie zur Bestimmung der Masse von Oligonukleotiden wurde auf einem *Bruker Autoflex II* Massenspektrometer der Firma *Bruker* durchgeführt. Die Angabe der Messwerte erfolgte in *m/z*. Zur Messung von Oligonukleotiden wurde eine HPA-Matrix verwendet (900 μL einer gesättigten HPA-Lösung und 100 μL einer Diammoniumhydrogencitrat-Lösung (100 g/L) in $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1)).

HPL-Chromatographie wurde nach dem *reverse-phase* Prinzip auf Anlagen von *Waters* (analytisch: *Alliance 2695* mit einem *Photo Diode Array Detector 2996*, präparativ: *Alliance 1525* mit einem *Dual wavelength UV-Detector 2487*) durchgeführt. Für analytische Trennungen wurden CC Nucleosil 100-3 C_{18} oder CC Nucleodur 100-3 C_{18} Säulen der Firma *Macherey & Nagel* verwendet. Präparative Trennungen wurden mit VP250-10 Nucleosil 100-7 C_{18} oder VP 250-10 Nucleodur 100-5 C_{18} Säulen der Firma *Macherey & Nagel* durchgeführt. Es wurden Gradientenmethoden mit Puffer A: 0.1 M Triethylammoniumacetat in Wasser und Puffer B: 0.1 M Triethylammoniumacetat in 20 % Wasser und 80 % Acetonitril verwendet.

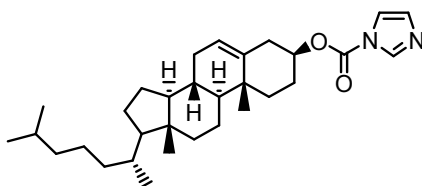
Oligonukleotidsynthese wurden auf einem 8900 *Expedite Nucleic Acid Synthesis System* der Firma *PerSeptive Biosystems* oder auf einem *Äkta Oligopilot* der Firma *Amersham Biosciences* durchgeführt. Die Phosphoramidite, der Aktivator ETT und das CPG-Trägermaterial wurden von den Firmen *Glen Research* und *Link Technologies* bezogen. Die DNA-Phosphoramidite und die Aktivatoren BTT und ETT wurden in Acetonitril der Firma *Riedel de Haen* oder *Sigma-Aldrich* (Wassergehalt ≤ 10 ppm) gelöst. Die TC RNA-Phosphoramidite wurden in Toluol der Firma *Fluka* (Wassergehalt ≤ 10 ppm) gelöst. Für die übrigen Reagenzien wurde Acetonitril der Firma *Roth* (Wassergehalt ≤ 30 ppm) als Lösungsmittel verwendet.

Oligonukleotidkonzentrationen wurden an einem *ND-1000* Spektrophotometer der Firma *NanoDrop Technologies* anhand der Absorption bei 260 nm bestimmt. Die Extinktionskoeffizienten der jeweiligen DNA-Oligonukleotide wurde aus der Summe der Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nukleoside (dA $15.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, dC $7.1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, dG $12.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, dT $8.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) berechnet. Die Berechnung der Extinktionskoeffizienten der jeweiligen RNA-Oligonukleotide erfolgte anhand der Korrelation ssDNA: $1.0 \text{ OD}(260) = 33 \text{ ng}/\mu\text{L}$, ssRNA: $1.0 \text{ OD}(260) = 40 \text{ ng}/\mu\text{L}$.

7.2 Synthesevorschriften

Für Arbeiten mit luft- und wasserempfindlichen Substanzen wurde die *Schlenk*-Technik angewendet. Dabei wurden die Reaktionen in Glasapparaturen durchgeführt, welche zuvor im Ölpumpenvakuum mit einer Heißluftpistole ausgeheizt und anschließend mit Stickstoff oder Argon befüllt worden waren. Die zum Transfer von Lösungen und Reagenzien verwendeten Kanülen und Spritzen wurden vor dem Gebrauch mit Stickstoff oder Argon gespült.

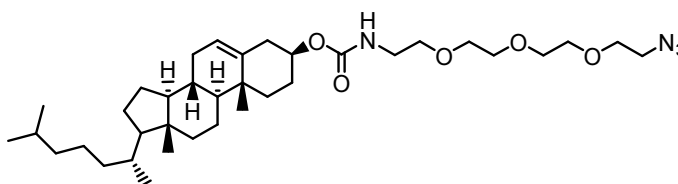
7.2.1.1 1*H*-Imidazol-cholest-5-en-3-yl-1-carboxylat (**31**)



Cholesterol (1.0 g, 2.59 mmol, 1.0 Äq.) wurde mit Carbonyldiimidazol (2.02 g, 12.50 mmol, 4.8 Äq.) in trockenem Dichlormethan (100 mL) unter Stickstoff gelöst und für 20 h bei RT gerührt. Die organische Phase wurde zweimal mit Wasser (250 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (250 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Einengen am Rotationsverdampfer lieferte 1*H*-Imidazol-cholest-5-en-3-yl-1-carboxylat (**31**) als farblosen Feststoff (1.12 g, 2.33 mmol, 90 %).

$R_f = 0.24$ (*i*Hex:EtOAc, 3:1); $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta = 8.10\text{--}8.12$ (*m*, 1H, ImH), 7.39–7.41 (*m*, 1H, ImH), 7.03–7.05 (*m*, 1H, NCHN), 5.42 (*d*, $^3J = 4.7$ Hz, 1H, C(6)H), 4.72–4.90 (*m*, 1H, C(3)H), 2.47 (*d*, $^3J = 7.8$ Hz, 2H, C(4)H₂), 0.82–2.08 (*m*, 26H, CH,CH₂), 1.04 (*s*, 3H, C(19)H₃), 0.91 (*d*, $^3J = 6.5$ Hz, 3H, C(21)H₃), 0.85–0.86 (*m*, 3H, C(27)H₃), 0.82–0.83 (*m*, 3H, C(26)H₃), 0.66 (*s*, 3H, C18H₃); HRMS (ESI): berechnet für $\text{C}_{31}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_2^+$ [M+H]⁺: 481.3789, gefunden: 481.3786.

7.2.1.2 *N*-((((Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)cholest-5-en-3-ylcarbamat (**23**)

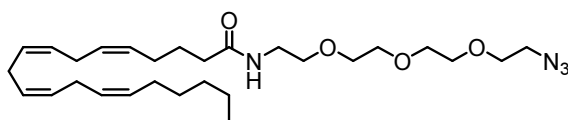


Cholesteryl-1*H*-imidazol-1-carboxylat (**31**) (200 mg, 416 μmol , 1.0 Äq.) wurde zusammen mit Azido-3,6,9-trioxaundekan-1-amin (180 mg, 825 μmol , 2.0 Äq.) in Chloroform (5 mL) unter Stickstoff gelöst und 4 Tage bei 50 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Ethylacetat (100 mL) verdünnt, dreimal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (50 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Aufreinen mittels Säulenchromatographie (*i*Hex:EtOAc, 5:1 → 2:1) lieferte *N*-((((Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)cholest-5-en-3-ylcarbamate (**23**) als farbloses Öl (153 mg, 243 μmol , 58 %).

$R_f = 0.27$ (*i*Hex:EtOAc, 1:1); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta = 5.33\text{--}5.46$ (*m*, 1H, C(6)H), 5.10 (*bs*, 1H, NH), 4.44–4.50 (*m*, 1H, C(3)H), 3.59–3.68 (*m*, 10H, CH₂), 3.53 (*t*, $^3J = 5.1$ Hz, 2H, C(1')H₂), 3.38 (*t*,

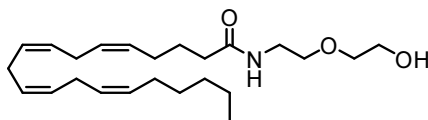
$^3J = 5.1$ Hz, 2H, CH_2N_3), 3.32-3.36 (*m*, 2H, $\text{C}(2')\text{H}_2$), 2.22-2.37 (*m*, 6H, CH , CH_2) 0.81-1.66 (*m*, 20H, CH , CH_2), 0.99 (*s*, 3H, $\text{C}(19)\text{H}_3$), 0.89 (*d*, $^3J = 6.5$ Hz, 3H, $\text{C}(21)\text{H}_3$), 0.85 (*d*, $^3J = 6.5$ Hz, 3H, $\text{C}(26)\text{H}_3$), 0.84 (*d*, $^3J = 6.5$ Hz, 3H, $\text{C}(27)\text{H}_3$), 0.65 (*s*, 3H, $\text{C}(18)\text{H}_3$); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta = 156.4$ (OCONH), 140.7 (C5), 122.7 (C6), 74.5 (C3), 70.9, 70.8, 70.4, 70.3, 56.9 (C14), 56.4 (C17), 50.9 (C8'), 50.2 (C9), 42.5 (C4), 42.5 (C13), 40.9 (C1'), 39.9 (C12), 39.7 (C24), 38.8, 37.2 (C1), 36.8 (C10), 36.4 (C20), 36.0 (C22), 32.1 (C7), 32.1 (C8), 32.1 (C2), 28.4 (C16), 28.2 (C25), 24.5 (C15), 24.1 (C23), 23.0 (C26), 22.8 (C27), 21.7 (C11), 19.6 (C19), 18.9 (C21), 12.1 (C18); HRMS (ESI): berechnet für $\text{C}_{36}\text{H}_{66}\text{N}_5\text{O}_5^+ [\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 648.5058, gefunden: 648.5051; FT-IR (ATR, cm^{-1}): 3348 (*w*), 2934 (*s*), 2900 (*m*), 2867 (*m*), 2360 (*w*), 2102 (*m*), 1716 (*s*), 1523 (*m*), 1466 (*m*), 1378 (*m*), 1330 (*w*), 1248 (*s*), 1198 (*w*), 1118 (*s*), 1030 (*s*), 1015 (*s*), 947 (*m*), 927 (*m*), 840 (*w*), 800 (*w*), 778 (*w*), 735 (*w*), 695 (*w*).

7.2.1.3 *N*-((((Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)arachidonoylamid (5)



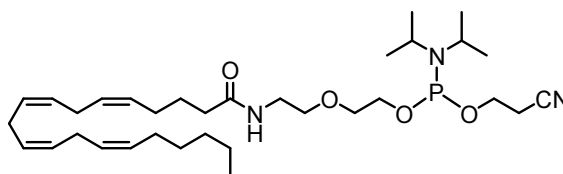
Arachidonsäure (260 mg, 854 μmol , 1.0 Äq.) wurde zusammen mit PyBOP (533 mg, 1.02 mmol, 1.2 Äq.) in trockenem DMF (5 mL) unter Stickstoff gelöst und nach 5 min Rühren bei RT mit DIPEA (166 mg, 1.28 mmol, 1.5 Äq.) versetzt. Nach 10 min Rühren bei RT wurde Azido-3,6,9-trioxaundekan-1-amin (205 mg, 939 μmol , 1.1 Äq.) zugegeben und weitere 3 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde am Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand mit Ethylacetat (100 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (50 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Säulenchromatographie (*i*Hex:EtOAc, 2:1 -> 1:5) lieferte *N*-((((Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)arachidonoylamid (5) als farbloses Öl (412 mg, 816 μmol , 96 %).

$R_f = 0.15$ (*i*Hex:EtOAc, 1:2); ^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta = 6.00$ (*bs*, 1H, NH), 5.27-5.40 (*m*, 8H, CH), 3.62-3.66 (*m*, 8H, CH_2), 3.59-3.61 (*m*, 2H, CH_2), 3.52 (*t*, $^3J = 5.1$ Hz, 2H, $\text{C}(2')\text{H}_2$), 3.42 (*dt*, $^3J = 10.3$ Hz, $^3J = 5.1$ Hz, 2H, $\text{C}(1')\text{H}_2$), 3.36 (*t*, $^3J = 5.1$ Hz, 2H, CH_2N_3), 2.76-2.82 (*m*, 6H, $\text{C}(7)\text{H}_2$, $\text{C}(10)\text{H}_2$, $\text{C}(13)\text{H}_2$), 2.16 (*t*, $^3J = 7.8$ Hz, 2H, $\text{C}(2)\text{H}_2$), 2.00-2.11 (*m*, 4H, $\text{C}(4)\text{H}_2$, $\text{C}(16)\text{H}_2$), 1.71 (*t*, $^3J = 7.8$ Hz, 2H, $\text{C}(3)\text{H}_2$), 1.22-1.36 (*m*, 6H, $\text{C}(17)\text{H}_2$, $\text{C}(18)\text{H}_2$, $\text{C}(19)\text{H}_2$), 0.88 (*t*, $^3J = 7.2$ Hz, 3H, $\text{C}(20)\text{H}_3$); ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta = 173.0$ (CO), 130.7 (CH), 129.4 (CH), 128.8 (CH), 128.4 (CH), 128.4 (CH), 128.1 (CH), 127.7 (CH), 70.9 (CH_2), 70.8 (CH_2), 70.8 (CH_2), 70.7 (CH_2), 70.4 (CH_2), 70.3 (CH_2), 70.1 (CH_2), 50.9 (CH_2N_3), 39.5 (C1'), 38.8 (C10), 36.2 (C2), 31.7 (C17), 29.5 (C18), 25.8 (C7), 25.8 (C13), 26.9 (C16), 25.7 (C3), 22.8 (C19), 14.3 (C20); HRMS (ESI): berechnet für $\text{C}_{28}\text{H}_{49}\text{N}_4\text{O}_4^+ [\text{M}+\text{H}]^+$: 505.3748, gefunden: 505.3756; FT-IR (ATR, cm^{-1}): 3310 (*w*), 2927 (*m*), 2869 (*m*), 2361 (*s*), 2341 (*m*), 2101 (*m*), 1918 (*w*), 1869 (*w*), 1829 (*w*), 1844 (*w*), 1792 (*w*), 1750 (*w*), 1734 (*w*), 1718 (*w*), 1684 (*w*), 1670 (*w*), 1653 (*s*), 1647 (*m*), 1636 (*m*), 1559 (*m*), 1540 (*m*), 1522 (*w*), 1507 (*w*), 1457 (*m*), 1437 (*w*), 1420 (*w*), 1396 (*w*), 1348 (*w*), 1284 (*w*), 1100 (*m*), 988 (*w*), 668 (*w*).

7.2.1.4 *N*-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethyl)arachidonoylamid (**4**)

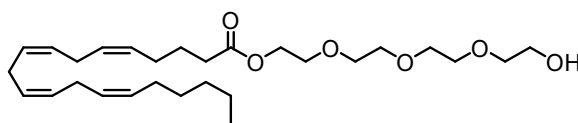
Arachidonsäure (200 mg, 657 μmol , 1.0 Äq.) wurde zusammen mit PyBOP (410 mg, 788 μmol , 1.2 Äq.) in trockenem Dichlormethan (10 mL) unter Stickstoff gelöst und nach 5 min Rühren bei RT mit DIPEA (127 mg, 985 μmol , 1.5 Äq.) versetzt. Nach 10 min Rühren bei RT wurde 2(2-Aminoethoxy)ethanol (83 mg, 788 μmol , 1.2 Äq.) zugegeben und weitere 20 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde eingeeengt und mittels Säulenchromatographie (DCM:MeOH, 100:1 \rightarrow 20:1) aufgereinigt. Man erhielt *N*-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethyl)arachidonoylamid (**4**) in Form eines farblosen Öls (233 mg, 596 μmol , 91 %).

R_f = 0.44 (DCM:MeOH, 20:1); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , ppm): δ = 6.54 (*bs*, 1H, *NH*), 5.24-5.35 (*m*, 8H, *CH*), 3.64-3.68 (*m*, 2H, *CH}_2*), 3.55 (*bs*, 1H, *OH*), 3.37-5.51 (*m*, 4H, *CH}_2*), 3.36-3.40 (*m*, 2H, *CH}_2*), 2.72-2.87 (*m*, 6H, *C(7)H}_2*, *C(10)H}_2*, *C(13)H}_2*), 2.12-2.16 (*m*, 2H, *C(2)H}_2*), 2.02-2.06 (*m*, 2H, *C(4)H}_2*), 1.96-2.01 (*m*, 2H, *C(16)H}_2*), 1.63 (*t*, 3J = 7.8 Hz, 2H, *C(3)H}_2*), 1.19-1.32 (*m*, 6H, *C(17)H}_2*, *C(18)H}_2*, *C(19)H}_2*), 0.82 (*t*, 3J = 7.0 Hz, 3H, *C(20)H}_3*); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , ppm): δ = 174.0 (CO), 130.5 (CH), 129.1 (CH), 128.7 (CH), 128.6 (CH), 128.3 (CH), 128.2 (CH), 127.8 (CH), 127.5 (CH), 72.4 (CH_2), 70.1 (CH_2), 61.4 (CH_2), 40.0 (C2), 39.3 (CH_2), 31.5 (C17), 29.3 (C18), 27.2 (C4), 26.7 (C16), 25.6 (C13), 25.6 (C10), 25.6 (C7), 25.6 (C3), 22.6 (C19), 14.1 (C20); HRMS (ESI): berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{NO}_3\text{Na}^+$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: 414.2979, gefunden: 414.2977; FT-IR (ATR, cm^{-1}): 3297 (*m*), 3087 (*w*), 3011 (*m*), 2953 (*m*), 2925 (*s*), 2858 (*s*), 1643 (*s*), 1548 (*s*), 1549 (*s*), 1455 (*m*), 1391 (*w*), 1378 (*m*), 1265 (*m*), 1127 (*s*), 1067 (*s*), 971 (*w*), 913 (*w*), 888 (*m*), 702 (*s*).

7.2.1.5 *N*-2-(2-Arachidonoylamidoethoxy)ethyl(2-cyanoethyl)diisopropylphosphoramidit (**1**)

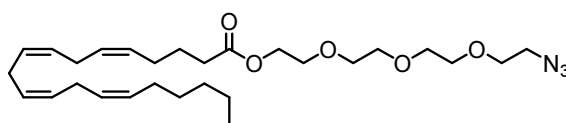
N-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethyl)arachidonoylamid (**4**) (176 mg, 449 μmol , 1.0 Äq.) wurde in trockenem Dichlormethan (4 mL) unter Argon gelöst und mit DIPEA (0.4 mL, 2.25 mmol, 5.0 Äq.) versetzt. Nach Zugabe von 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (301 μL , 1.35 mmol, 3.0 Äq.) wurde für 3 h bei RT gerührt. Aufreinigen mittels Säulenchromatographie (DCM:MeOH+Py, 40:1+1 %) lieferte 2-(2-Arachidonoylamidoethoxy)ethyl(2-cyanoethyl)diisopropylphosphoramidit (**1**) als farbloses Öl (242 mg, 409 μmol , 91 %).

R_f = 0.38 (DCM:MeOH, 20:1); $^{31}\text{P-NMR}$ (81 MHz, CD_2Cl_2 , ppm): δ = 150.5, 149.4.

7.2.1.6 2-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-arachidonoat (**24**)

Arachidonsäure (200 mg, 657 μmol , 1.0 Äq.) wurde zusammen mit PyBOP (513 mg, 986 μmol , 1.5 Äq.) in trockenem Dichlormethan (5 mL) unter Stickstoff gelöst und nach 5 min Rühren bei RT mit DIPEA (572 mg, 3.29 mmol, 5 Äq.) versetzt. Nach 10 min Rühren bei RT wurde Tetraethylenglykol (1.26 g, 6.57 mmol, 10.0 Äq.) zugegeben und weitere 20 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Dichlormethan (45 mL) verdünnt, dreimal mit Wasser (100 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Aufreinigen mittels Säulenchromatographie (*i*Hex:EtOAc, 1:3) lieferte 2-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-arachidonoat (**24**) als hellbraunes Öl (268 mg, 558 μmol , 85 %).

R_f = 0.23 (*i*Hex:EtOAc, 3:1); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , ppm): δ = 5.29-5.40 (*m*, 8H, CH), 4.22 (*t*, 3J = 4.2 Hz, 2H, CH_2OCO), 3.70-3.73 (*m*, 2H, CH_2), 3.61-3.68 (*m*, 10H, CH_2), 3.58-3.60 (*m*, 2H, CH_2), 2.76-2.82 (*m*, 6H, C(7) H_2 , C(10) H_2 , C(13) H_2), 2.67 (*bs*, 1H, OH), 2.32 (*t*, 3J = 7.8 Hz, 2H, C(2) H_2), 2.06-2.10 (*m*, 2H, C(4) H_2), 2.00-2.05 (*m*, 2H, C(16) H_2), 1.68 (*t*, 3J = 7.8 Hz, 2H, C(3) H_2), 1.22-1.36 (*m*, 6H, C(17) H_2 , C(18) H_2 , C(19) H_2), 0.86 (*t*, 3J = 7.2 Hz, 3H, C(20) H_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , ppm): δ = 174.1 (CO), 130.7 (CH), 129.1 (CH), 129.0 (CH), 128.8 (CH), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 128.0 (CH), 127.7 (CH), 72.5 (CH_2), 70.6 (CH_2), 70.5 (CH_2), 70.5 (CH_2), 70.2 (CH_2), 69.6 (CH_2), 63.5 (CH_2OCO), 61.8 (CH_2), 33.8 (C2), 31.7 (C17), 29.4 (C18), 27.4 (C4), 26.7 (C16), 25.8 (C7), 25.8 (C10), 25.8 (C13), 24.9 (C3), 22.7 (C19), 14.2 (C20); HRMS (ESI): berechnet für $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}_6\text{Na}^+$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: 503.3343, gefunden: 503.3342; FT-IR (ATR, cm^{-1}): 3384 (*w*), 3009 (*w*), 2871 (*m*), 1731 (*m*), 1652 (*w*), 1455 (*m*), 1378 (*w*), 1349 (*m*), 1247 (*m*), 1097 (*s*), 949 (*m*), 914 (*m*), 840 (*vs*), 730 (*m*).

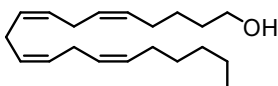
7.2.1.7 2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-arachidonoat (**21**)

2-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-arachidonoat (**24**) (100 mg, 208 μmol , 1.0 Äq.) wurde in DMF: CCl_4 (4:1, 5 mL) gelöst und mit Triphenylphosphin (82 mg, 312 μmol , 1.5 Äq.) und Natriumazid (20 mg, 312 μmol , 1.5 Äq) versetzt. Nach 2 h Rühren bei 60 °C wurde Wasser (2 mL) zugegeben und weitere 20 min bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Dichlormethan (45 mL) verdünnt, dreimal mit Wasser (100 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Aufreinigen mittels Säulenchromatographie (*i*Hex:EtOAc, 1:3) lieferte 2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-arachidonoat (**21**) als farbloses Öl (104 mg, 205 μmol , 99 %).

R_f = 0.30 (*i*Hex:EtOAc, 2:1); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , ppm): δ = 5.28-5.39 (*m*, 8H, CH), 4.20 (*t*, 3J = 4.9 Hz, 2H, CH_2OCO), 3.61-3.68 (*m*, 12H, CH_2), 3.35 (*t*, 3J = 5.0 Hz, 2H, CH_2N_3), 2.76-2.82 (*m*, 6H, C(7) H_2 , C(10) H_2 , C(13) H_2), 2.32 (*t*, 3J = 7.6 Hz, 2H, C(2) H_2), 2.06-2.11 (*m*, 2H, C(4) H_2), 2.00-2.05 (*m*, 2H, C(16) H_2), 1.68 (*t*, 3J = 7.6 Hz, 2H, C(3) H_2), 1.22-1.35 (*m*, 6H, C(17) H_2 , C(18) H_2 , C(19) H_2), 0.86 (*t*, 3J = 7.1 Hz, 3H, C(20) H_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , ppm): δ = 173.7 (CO), 130.7 (CH), 129.1 (CH),

129.0 (CH), 128.8 (CH), 128.4 (CH), 128.4 (CH), 128.0 (CH), 127.7 (CH), 70.9 (CH₂), 70.9 (CH₂), 70.8 (CH₂), 70.8 (CH₂), 70.2 (CH₂), 69.4 (CH₂), 63.6 (CH₂OCO), 50.9 (CH₂N₃), 33.8 (C₂), 31.7 (C₁₇), 29.5 (C₁₈), 27.4 (C₄), 26.7 (C₁₆), 25.8 (C₇), 25.8 (C₁₀), 25.8 (C₁₃), 25.0 (C₃), 22.8 (C₁₉), 14.2 (C₂₀); HRMS (ESI): berechnet für C₂₈H₄₇N₃O₅Na⁺ [M+Na]⁺: 528.3408, gefunden: 528.3405; FT-IR (ATR, cm⁻¹): 3321 (*w*), 2925 (*m*), 2869 (*m*), 2102 (*m*), 1732 (*m*), 1647 (*m*), 1732 (*m*), 1543 (*m*), 1455 (*m*), 1348 (*m*), 1284 (*m*), 1248 (*m*), 1096 (*s*), 972 (*m*), 947 (*m*), 844 (*s*), 726 (*m*).

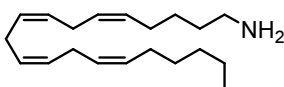
7.2.1.8 Arachidonylalkohol (27)



Arachidonsäure (200 mg, 657 µmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem THF (10 mL) unter Stickstoff gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Lithiumaluminiumhydrid (328 µL, 788 µmol, 1.2 Äq.) wurde zugetropft und das Reaktionsgemisch für 1 h bei 0 °C und anschließend 1 h bei RT gerührt. Nach Zutropfen von Wasser (1 mL) wurde mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung (100 mL) verdünnt und viermal mit Dichlormethan (50 mL) extrahiert. Trocknen über MgSO₄ und Einengen am Rotationsverdampfer lieferte Arachidonylalkohol (27) als hellgelbes Öl (184 mg, 633 µmol, 96 %).

R_f = 0.38 (*i*Hex:EtOAc, 2:1); ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 5.25-5.43 (*m*, 8H, CH), 3.58 (*t*, ³*J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂OH), 2.73-2.82 (*m*, 6H, C(7)H₂, C(10)H₂, C(13)H₂), 2.38 (*bs*, 1H, OH), 1.96-2.13 (*m*, 4H, C(4)H₂, C(16)H₂), 1.20-1.61 (*m*, 10H, C(2)H₂, C(3)H₂, C(17)H₂, C(18)H₂, C(19)H₂), 0.85 (*t*, ³*J* = 6.8 Hz, 3H, C(20)H₃); HRMS (EI): berechnet für C₂₀H₃₄O⁺ [M]⁺: 290.2604, gefunden: 290.2599; FT-IR (ATR, cm⁻¹): 3011 (*m*), 2955 (*m*), 2924 (*s*), 2855 (*s*), 1645 (*w*), 1455 (*m*), 1389 (*m*), 1265 (*w*), 1040 (*m*), 914 (*m*), 819 (*m*).

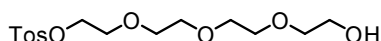
7.2.1.9 Arachidonylamin (25)



Arachidonylalkohol (27) (220 mg, 757 µmol, 1.0 Äq.) wurde in DMF:CCl₄ (4:1, 5 mL) gelöst und mit Triphenylphosphin (298 mg, 1.14 mol, 1.5 Äq.) und Natriumazid (74 mg, 1.14 mol, 1.5 Äq.) versetzt. Nach 2 h Rühren bei 50 °C wurde Wasser (2 mL) zugegeben und weitere 20 min bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Isohexan (100 mL) verdünnt, dreimal mit Wasser (80 mL) ausgeschüttelt und über MgSO₄ getrocknet. Aufreinigen mittels Säulenchromatographie (*i*Hex:EtOAc, 50:1) lieferte Arachidonylazid als farbloses Öl (121 mg, 384 µmol). Arachidonylazid wurde in trockenem THF (5 mL) unter Stickstoff gelöst auf 0 °C abgekühlt. Lithium-aluminium-hydrid (174 µL, 418 µmol, 1.1 Äq.) wurde zugetropft und das Reaktionsgemisch für 3 h bei 0 °C und anschließend 1 h bei RT gerührt. Nach Zutropfen von Wasser (1 mL) wurde mit Dichlormethan (100 mL) verdünnt und dreimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (70 mL) gewaschen. Trocknen über MgSO₄ und Einengen am Rotationsverdampfer lieferte Arachidonylamin (25) als hellgelbes Öl (101 mg, 345 µmol, 46 %).

$R_f = 0.10$ (DCM:MeOH:NEt₃, 10:1:1 %); ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, ppm): $\delta = 5.29-5.40$ (*m*, 8H, CH), 2.76-2.83 (*m*, 6H, C(7)H₂, C(10)H₂, C(13)H₂), 2.66 (*t*, ³*J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂NH₂), 2.00-2.08 (*m*, 4H, C(4)H₂, C(16)H₂), 1.61 (*bs*, 2H, NH₂), 0.86 (*t*, ³*J* = 7.1 Hz, 3H, C(20)H₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, ppm): $\delta = 130.7$ (CH), 130.2 (CH), 128.7 (CH), 128.5 (CH), 128.2 (CH), 128.1 (CH), 128.0 (CH), 127.7 (CH), 42.2 (CH₂NH₂), 33.6 (C2), 31.7 (C17), 29.5 (C18), 27.4 (C4), 27.2 (C3), 27.1 (C16), 25.8 (C7), 25.8 (C10), 25.8 (C13), 22.8 (C19), 14.3 (C20); HRMS (ESI): berechnet für C₂₀H₃₆N⁺ [M+H]⁺: 290.2842, gefunden: 290.2842; FT-IR (ATR, cm⁻¹): 3011 (*m*), 2955 (*m*), 2924 (*vs*), 2855 (*s*), 2360 (*vw*), 1645 (*w*), 1575 (*m*), 1456 (*s*), 1391 (*m*), 1318 (*m*), 1265 (*w*), 1042 (*w*), 912 (*m*), 818 (*m*).

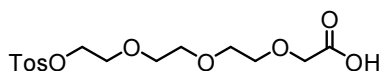
7.2.1.10 2-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-4-methylbenzylsulfonat (40)



Tetraethylenglykol (5.0 g, 25.7 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem THF (20 mL) unter Stickstoff gelöst, auf 0 °C abgekühlt und mit Triethylamin (18 mL, 129 mmol, 5.0 Äq.) versetzt. Tosylchlorid (4.90 g, 25.7 mmol, 1.0 Äq.) wurde über einen Zeitraum von 30 min zugegeben und 2 h bei 0 °C gerührt. Nach 24 h Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch mit verdünnter Salzsäure (1 M, 100 mL) aufgenommen und viermal mit Dichlormethan (60 mL) extrahiert. Trocknen über MgSO₄ und Aufreinigen mittels Säulenchromatographie (DCM:MeOH, 50:1) lieferte 2-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-4-methylbenzylsulfonat (**40**) als farbloses Öl (8.06 g, 23.1 mmol, 90 %).

$R_f = 0.34$ (DCM:MeOH, 10:1); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, ppm): $\delta = 7.74$ (*d*, ³*J* = 8.4 Hz, 2H, CH), 7.29 (*d*, ³*J* = 8.4 Hz, 2H, CH), 4.07-4.14 (*m*, 2H, CH₂OTos), 3.48-3.68 (*m*, 14H, CH₂), 2.57 (*bs*, 1H, OH), 2.39 (*s*, 3H, CH₃); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, ppm): $\delta = 144.9$ (Cq), 133.1 (Cq), 129.9 (CH), 128.0 (CH), 72.6 (CH₂), 70.8 (CH₂), 70.7 (CH₂), 70.5 (CH₂), 70.4 (CH₂), 69.3 (CH₂OTos), 68.8 (CH₂), 61.8 (CH₂OH), 21.7 (CH₃); HRMS (ESI): berechnet für C₁₅H₂₄O₇Na⁺ [M+Na]⁺: 371.1135, gefunden: 371.1133; FT-IR (ATR, cm⁻¹): 3430 (*w*), 2870 (*w*), 1350 (*m*), 1172 (*vs*), 1095 (*s*), 916 (*vs*).

7.2.1.11 2-(2-(2-(2-(Tosyloxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxyessigsäure (41)

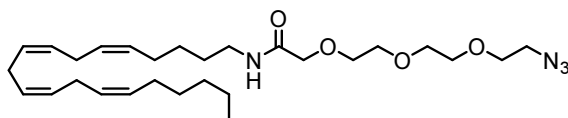


Chrom(VI)oxid (7.0 g, 70 mmol, 20.0 Äq.) wurde in Wasser (40 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zutropfen von konzentrierter Schwefelsäure (10 mL) wurde 5 min gerührt und anschließend mit Aceton (20 mL) verdünnt. 2-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-4-methylbenzylsulfonat (**40**) (1.2 g, 3.4 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Aceton (20 mL) gelöst und langsam zur Chrom-Lösung zuge tropft. Das Reaktionsgemisch wurde 10 min bei 0 °C und 16 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von Isopropanol (20 mL) wurde mit Wasser (200 mL) verdünnt und viermal mit Dichlormethan (50 mL) extrahiert. Trocknen über MgSO₄ und anschließendes Aufreinigen mittels Säulenchromatographie (DCM:MeOH:AcOH, 1000:2:1) lieferte 2-(2-(2-(2-(Tosyloxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxyessigsäure (**41**) als farbloses Öl (962 mg, 2.65 mmol, 78 %).

$R_f = 0.31$ (DCM:MeOH, 10:1); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, ppm): $\delta = 9.88$ (*bs*, 1H, CO₂H), 7.74 (*d*, ³*J* = 8.4 Hz, 2H, CH), 7.29 (*d*, ³*J* = 8.4 Hz, 2H, CH), 4.03-4.17 (*m*, 4H, CH₂OTos, CH₂CO₂H), 3.52-3.74 (*m*,

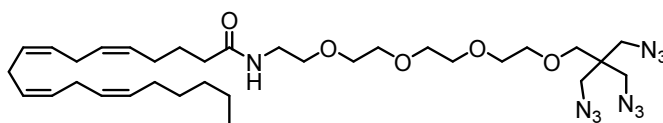
10H, CH₂), 2.39 (s, 3H, CH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 174.3 (CO₂H), 150.0 (Cq), 132.9 (Cq), 130.0 (CH), 128.0 (CH), 71.3 (CH₂), 70.7 (CH₂), 70.4 (CH₂), 69.4 (CH₂), 69.2 (CH₂), 68.8 (CH₂), 68.5 (CH₂), 21.7 (CH₃); HRMS (ESI): berechnet für C₁₅H₂₁O₈S⁻ [M-H]⁻: 361.0963, gefunden: 361.0961; FT-IR (ATR, cm⁻¹): 3291 (m), 3081 (w), 2907 (m), 2866 (m), 1640 (s), 1552 (s), 1471 (m), 1454 (m), 1427 (m), 1404 (w), 1348 (m), 1295 (m), 1232 (w), 1186 (vw), 1121 (s), 1040 (s), 932 (m), 886 (w), 777 (m), 681 (s).

7.2.1.12 N-(2-(2-(2-(2-(Tosyloxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)acetyl)arachidonylamid (22)



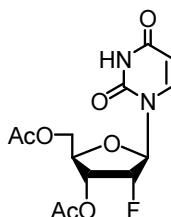
2-(2-(2-(2-(Tosyloxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)essigsäure (**41**) (900 mg, 2.48 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Ethanol (20 mL) gelöst und mit Natriumazid (807 mg, 12.4 mmol, 5.0 Äq.) und Triethylamin (5 mL) versetzt. Nach 48 h Rühren bei 70 °C wurde mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (150 mL) verdünnt und dreimal mit Dichlormethan (70 mL) extrahiert. Trocknen über MgSO₄ und Einengen am Rotationsverdampfer lieferte 2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)essigsäure (**X**) als hellbraunes Öl (403 mg, 1.73 mmol). Die Azidosäure **26** (200 mg, 858 µmol, 5.0 Äq.) wurde zusammen mit PyBOP (674 mg, 1.3 mmol, 7.5 Äq.) in trockenem Dichlormethan (10 mL) unter Stickstoff gelöst und mit DIPEA (0.75 mL, 4.31 mmol, 25.0 Äq.) versetzt. Arachidonylamin (**25**) (50 mg, 173 µmol, 1.0 Äq.) wurde in Dichlormethan (10 mL) angelöst und zum Reaktionsgemisch zugetropft. Nach 16 h Rühren bei RT wurde mit Ethylacetat (150 mL) verdünnt und dreimal mit verdünnter Salzsäure (1 M, 80 mL) ausgeschüttelt. Trocknen über MgSO₄ und Aufreinigen mittels Säulenchromatographie (iHex:EtOAc, 1:1) lieferte N-2-(2-(2-(2-(Tosyloxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)acetyl-arachidonylamid (**X**) als hellgelbes Öl (57 mg, 113 µmol, 46 %).

R_f = 0.40 (iHex:EtOAc, 1:5); ¹H-NMR (600 MHz, DMSO, ppm): δ = 7.58 (bs, 1H, NH), 5.23-5.37 (m, 8H, CH), 3.82 (s, 2H, NHOCCH₂), 3.48-3.60 (m, 10H, CH₂), 3.36 (t, ³J = 5.0 Hz, 2H, CH₂N₃), 3.07 (dd, ³J = 6.8 Hz, 2H, CH₂NHOC), 2.72-2.79 (m, 6H, C(7)H₂, C(10)H₂, C(13)H₂), 1.97-2.05 (m, 4H, C(4)H₂, C(16)H₂), 1.35-1.46 (m, 2H, C(3)H₂), 1.17-1.34 (m, 8H, C(2)H₂, C(17)H₂, C(18)H₂, C(19)H₂), 0.83 (t, ³J = 6.9 Hz, 3H, C(20)H₃); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO, ppm): δ = 168.9 (Cq), 130.7 (CH), 130.2 (CH), 128.7 (CH), 128.5 (CH), 128.2 (CH), 128.1 (CH), 128.0 (CH), 127.7 (CH), 70.2 (CH₂), 69.9 (CH₂), 69.7 (CH₂), 69.6 (CH₂), 69.5 (CH₂), 69.2 (CH₂), 50.0 (CH₂N₃), 37.9 (C1), 30.9 (C17), 28.8 (C18), 28.7 (C2), 26.6 (C4), 26.3 (C16), 25.3 (C3), 25.1 (C7), 25.1 (C10), 25.1 (C13), 23.0 (C19), 13.9 (C20); HRMS (ESI): berechnet für C₂₈H₄₈N₄O₄Na⁺ [M+Na]⁺: 527.3568, gefunden: 527.3566; FT-IR (ATR, cm⁻¹): 3321 (w), 2927 (m), 2868 (m), 2102 (m), 1722 (w), 1645 (s), 1544 (m), 1455 (m), 1347 (m), 1283 (s), 1246 (w), 1090 (s), 977 (m), 852 (w), 725 (w).

7.2.1.13 *N*-(15-Azido-14,14-bis(azidomethyl)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan)arachidonoylamid (**33**)

Arachidonsäure (20 mg, 65.7 μmol , 1.3 Äq.) wurde zusammen mit TBTU (25 mg, 77.7 μmol , 1.5 Äq.) in trockenem DMF (2 mL) unter Stickstoff gelöst und mit DIPEA (44 μL , 259 μmol , 5.0 Äq.) versetzt. Nach Zugabe von 15-Azido-14,14-bis(azidomethyl)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-1-amin (**34**) (20 mg, 51.8 μmol , 1.0 Äq.) wurde 16 h bei 35 °C gerührt, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (30 mL) verdünnt und viermal mit Dichlormethan (30 mL) extrahiert. Trocknen über MgSO_4 und Aufreinigen mittels Säulenchromatographie (*i*Hex:EtOAc, 1:2) lieferte *N*-(15-azido-14,14-bis(azidomethyl)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan)arachidonoylamid (**33**) als farbloses Öl (42 mg, 62.4 μmol , 95 %).

R_f = 0.23 (*i*Hex:EtOAc, 1:3); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO, ppm): δ = 7.80 (*bs*, 1H, NH), 5.25-5.42 (*m*, 8H, CH), 3.46-3.57 (*m*, 12H, CH_2), 3.39 (*t*, 3J = 6.0 Hz, 2H, $\text{C}(2')\text{H}_2$), 3.36 (*s*, 6H, CH_2N_3), 3.30 (*s*, 2H, OCH_2Cq), 3.18 (*dt*, 3J = 6.0 Hz, 2H, $\text{C}(1')\text{H}_2$), 2.75-2.83 (*m*, 6H, $\text{C}(7)\text{H}_2$, $\text{C}(10)\text{H}_2$, $\text{C}(13)\text{H}_2$), 1.99-2.09 (*m*, 6H, $\text{C}(2)\text{H}_2$, $\text{C}(4)\text{H}_2$, $\text{C}(16)\text{H}_2$), 1.54 (*tt*, 3J = 7.8 Hz, 2H, $\text{C}(3)\text{H}_2$), 1.21-1.36 (*m*, 6H, $\text{C}(17)\text{H}_2$, $\text{C}(18)\text{H}_2$, $\text{C}(19)\text{H}_2$), 0.86 (*t*, 3J = 7.1 Hz, 3H, $\text{C}(20)\text{H}_3$); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO, ppm): δ = 171.9 (Cq), 129.9 (CH), 129.4 (CH), 128.1 (CH), 128.0 (CH), 127.9 (CH), 127.7 (CH), 127.6 (CH), 127.5 (CH), 70.3 (CH_2), 69.9 (CH_2), 69.8 (CH_2), 69.6 (CH_2), 69.5 (CH_2), 69.4 (CH_2), 69.2 (CH_2), 51.5 (CH_2N_3), 44.2 (Cq), 38.4 ($\text{C}(1')$), 34.7 (C2), 30.9 (C17), 28.7 (C18), 26.6 (C4), 26.2 (C16), 25.3 (C3), 25.2 (C7), 25.2 (C10), 25.2 (C13), 23.0 (C19), 13.9 (C20); HRMS (ESI): berechnet für $\text{C}_{33}\text{H}_{56}\text{N}_{10}\text{O}_5\text{Na}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 695.4327, gefunden: 695.4321; FT-IR (ATR, cm^{-1}): 3310 (*w*), 2927 (*m*), 2868 (*m*), 2101 (*m*), 1725 (*w*), 1644 (*s*), 1544 (*m*), 1456 (*m*), 1347 (*m*), 1284 (*m*), 1094 (*vs*), 972 (*m*), 945 (*m*), 852 (*m*), 726 (*m*).

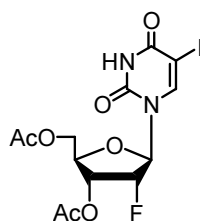
7.2.1.14 3',5'-Di-O-acetyl-2'-desoxy-2'-fluoro-uridin (**11**)

2'-Desoxy-2'-fluoro-uridin (5.00 g, 20.3 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Pyridin (100 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach portionierter Zugabe von Essigsäureanhydrid (20.73 g, 203 mmol, 10.0 Äq.) wurde 1 h bei 0 °C und anschließend 1 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde eingeeengt und zweimal mit Methanol (100 mL) aufgenommen und wieder eingeeengt. Nach Trocknen am Hochvakuum erhielt man 3',5'-Di-O-acetyl-2'-desoxy-2'-fluoro-uridin (**11**) als farblosen Feststoff (6.52 g, 19.7 mmol, 97 %).

R_f = 0.55 (DCM:MeOH, 10:1); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO, ppm): δ = 11.48 (*bs*, 1H, NH), 7.72 (*d*, 3J = 8.0 Hz, 1H, $\text{C}(6)\text{H}$), 5.87 (*dd*, 3J = 22.3 Hz, 3J = 2.1 Hz, 1H, $\text{C}(1')\text{H}$), 5.69 (*dd*, 3J = 8.0 Hz, 4J = 2.2 Hz, 1H, $\text{C}(5)\text{H}$), 5.53 (*ddd*, 2J = 52.5 Hz, 3J = 5.3 Hz, 3J = 2.1 Hz, 1H, $\text{C}(2')\text{H}$), 5.26 (*ddd*, 3J = 17.2 Hz,

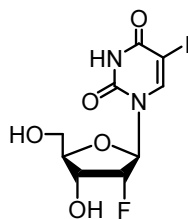
$^3J = 7.9$ Hz, $^3J = 5.3$ Hz, 1H, C(3')H), 4.31 (*dd*, $^2J = 12.0$ Hz, $^3J = 2.9$ Hz, 1H, C(5')H), 4.24 (*ddd*, $^3J = 7.9$ Hz, $^3J = 5.6$ Hz, $^3J = 2.9$ Hz, 1H, C(4')H), 4.23 (*dd*, $^2J = 12.0$ Hz, $^3J = 5.6$ Hz, 1H, C(5')H), 2.11 (*s*, 3H, CH₃), 2.04 (*s*, 3H, CH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO, ppm): $\delta = 170.1$, 169.6, 163.2 (C4), 150.2 (C2), 142.5 (C6), 102.1 (C5), 91.2 (*d*, $^1J = 111.7$ Hz, C2'), 90.9 (*d*, $^2J = 36.4$ Hz, C1'), 77.9 (C4'), 70.3 (*d*, $^2J = 14.9$ Hz), 62.7 (C5'), 20.5 (CH₃), 20.3 (CH₃); HRMS (ESI): berechnet für C₁₃H₁₄FN₂O₇⁻ [M-H]⁻: 329.0863, gefunden: 329.0861; FT-IR (ATR, cm⁻¹): 1738 (*m*), 1718 (*s*), 1676 (*s*), 1622 (*w*), 1471 (*w*), 1418 (*m*), 1383 (*m*), 1364 (*m*), 1299 (*w*), 1267 (*m*), 1239 (*s*), 1096 (*m*), 1075 (*s*), 1050 (*s*), 994 (*w*), 969 (*w*), 901 (*m*), 879 (*w*), 866 (*w*), 826 (*m*), 764 (*m*), 753 (*m*), 732 (*w*), 699 (*w*), 683 (*w*).

7.2.1.15 3',5'-Di-O-acetyl-2'-desoxy-2'-fluoro-5-iodo-uridin (12)



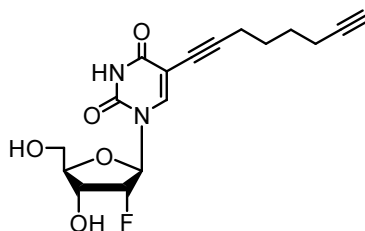
3',5'-Di-O-acetyl-2'-desoxy-2'-fluoro-uridin (**11**) (6.5 g, 19.68 mmol, 1.0 Äq.) wurde mit Iod (2.49 g, 9.84 mmol, 0.5 Äq.) und (NH₄)₂[Ce(NO₃)₆] (5.39 g, 9.84 mmol, 0.5 Äq.) in Acetonitril (150 mL) gelöst und 1.5 h bei 90 °C unter Rückfluss gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde eingeeengt und mittels Säulenchromatographie gereinigt (DCM:MeOH, 50:1). Man erhielt 3',5'-Di-O-acetyl-2'-desoxy-2'-fluoro-5-iodo-uridin (**12**) als farblosen Feststoff (8.31 g, 18.22 mmol, 93 %).

R_f = 0.55 (DCM:MeOH, 10:1); ^1H -NMR (400 MHz, DMSO, ppm): $\delta = 11.83$ (*bs*, 1H, NH), 8.18 (*s*, 1H, C(6)H), 5.86 (*dd*, $^3J = 22.1$ Hz, $^3J = 2.1$ Hz, 1H, C(1')H), 5.53 (*ddd*, $^2J = 52.4$ Hz, $^3J = 5.4$ Hz, $^3J = 2.1$ Hz, 1H, C(2')H), 5.27 (*ddd*, $^3J = 17.6$ Hz, $^3J = 8.0$ Hz, $^3J = 5.4$ Hz, 1H, C(3')H), 4.34 (*dd*, $^2J = 12.1$ Hz, $^3J = 2.8$ Hz, 1H, C(5')H), 4.28 (*ddd*, $^3J = 8.0$ Hz, $^3J = 5.2$ Hz, $^3J = 2.8$ Hz, 1H, C(4')H), 4.19 (*dd*, $^2J = 12.1$ Hz, $^3J = 5.2$ Hz, 1H, C(5')H), 2.11 (*s*, 3H, CH₃), 2.08 (*s*, 3H, CH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO, ppm): $\delta = 170.0$, 169.5, 160.6 (C4), 149.9 (C2), 146.3 (C6), 91.3 (*d*, $^1J = 111.7$ Hz, C2'), 90.9 (*d*, $^2J = 36.5$ Hz, C1'), 78.1 (C4'), 70.0 (C5), 69.5 (*d*, $^2J = 14.1$ Hz, C3'), 62.4 (C5'), 20.6 (CH₃), 20.2 (CH₃); HRMS (ESI): berechnet für C₁₃H₁₃FIN₂O₇⁻ [M-H]⁻: 454.9830, gefunden: 454.9824; FT-IR (ATR, cm⁻¹): 1738 (*m*), 1719 (*s*), 1676 (*s*), 1622 (*w*), 1470 (*w*), 1418 (*m*), 1431 (*w*), 1383 (*m*), 1364 (*m*), 1299 (*w*), 1267 (*m*), 1240 (*s*), 1195 (*m*), 1095 (*m*), 1075 (*s*), 1050 (*s*), 994 (*w*), 969 (*w*), 900 (*m*), 879 (*w*), 866 (*w*), 825 (*m*), 764 (*m*), 753 (*m*), 732 (*w*), 699 (*w*), 683 (*w*).

7.2.1.16 2'-Desoxy-2'-fluoro-5-iodo-uridin (**10**)

3',5'-Di-*O*-acetyl-2'-desoxy-2'-fluoro-5-iodo-uridin (**12**) (0.5 g, 1.10 mmol, 1.0 Äq.) wurde in einer Ammoniak/Methanol-Lösung (7 N, 20 mL) gelöst und 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt anschließend mittels Säulenchromatografie aufgereinigt (DCM:MeOH, 20:1 → DCM:MeOH, 10:1). Man erhielt 2'-Desoxy-2'-fluoro-5-iodo-uridin (**10**) in Form eines farblosen Feststoffs (0.386 g, 1.04 mmol, 95 %).

R_f = 0.35 (DCM:MeOH, 10:1); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO, ppm): δ = 11.71 (*bs*, 1H, NH), 8.52 (*s*, 1H, C(6)H), 5.85 (*d*, 3J = 16.7 Hz, 1H, C(1')H), 5.60 (*d*, 3J = 5.6 Hz, 1H, C(3')OH), 5.38 (*t*, 3J = 4.5 Hz, 1H, C(5')OH), 5.02 (*dd*, 2J = 53.1 Hz, 3J = 3.9 Hz, 1H, C(2')H) 4.21-4.13 (*m*, 1H, C(3')H), 3.89 (*d*, 3J = 8.2 Hz, 1H, C(4')H), 3.83-3.78 (*m*, 1H, C(5')H) 3.61-3.57 (*m*, 1H, C(5')H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO, ppm): δ = 160.6 (C4), 150.0 (C2), 144.7 (C6), 94.1 (*d*, 1J = 185.3 Hz, C2'), 87.4 (*d*, 2J = 34.2 Hz, C1'), 83 (C5'), 69.1 (C5), 66.7 (*d*, 2J = 16.3 Hz, C3'), 58.5 (C4'); HRMS (ESI): berechnet für $\text{C}_9\text{H}_9\text{FIN}_2\text{O}_7^-$ [M-H] $^-$: 370.9618, gefunden: 370.9616; FT-IR (ATR, cm^{-1}): 1703 (*m*), 1686 (*m*), 1680 (*m*), 1665 (*m*), 1658 (*m*), 1648 (*m*), 1644 (*m*), 1633 (*m*), 1612 (*w*), 1458 (*s*), 1449 (*s*), 1435 (*s*), 1428 (*s*), 1421 (*s*), 1415 (*s*), 1403 (*m*), 1320 (*s*), 1290 (*m*), 1264 (*m*), 1127 (*w*), 1109 (*w*), 1070 (*w*), 1040 (*m*), 816 (*m*), 701 (*m*), 685 (*m*), 668 (*w*).

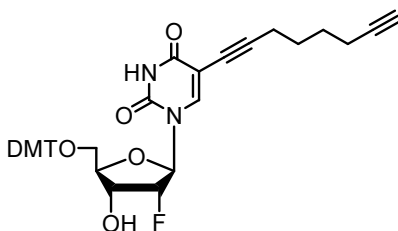
7.2.1.17 5-(Okta-1,7-diänyl)-2'-desoxy-2'-fluoro-uridin (**13**)

2'-Desoxy-2'-fluoro-5-iodo-uridin (**10**) (5.0 g, 13.4 mmol, 1.0 Äq.) wurde mit $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (943 mg, 1.34 mmol, 0.1 Äq.) und CuI (512 mg, 2.69 mmol, 0.2 Äq.) in trockenem DMF (60 mL) unter Stickstoff gelöst und mit DIPEA (22.8 mL, 134 mmol, 10.0 Äq.) versetzt. Nach 10 min Rühren bei RT wurde Okta-1,7-diin (17.8 mL, 134 mmol, 10.0 Äq.) zugegeben und 16 h bei RT weitergerührt. Das Reaktionsgemisch wurde eingeeengt und mittels Säulenchromatografie aufgereinigt (DCM:MeOH, 100:1 → DCM:MeOH, 14:1). Man erhielt 5-(Okta-1,7-diänyl)-2'-desoxy-2'-fluoro-uridin (**13**) als hellgelben Feststoff (4.17 g, 11.9 mmol, 89 %).

R_f = 0.33 (DCM:MeOH, 10:1); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO, ppm): δ = 11.62 (*bs*, 1H, NH), 8.23 (*s*, 1H, C(6)H), 5.87 (*dd*, 3J = 17.3 Hz, 3J = 1.6 Hz, 1H, C(1')H), 5.58 (*d*, 3J = 6.5 Hz, 1H, C(3')OH), 5.29 (*t*, 3J = 4.8 Hz, 1H, C(5')OH), 5.02 (*ddd*, 2J = 53.2 Hz, 3J = 4.4 Hz, 3J = 1.6 Hz, 1H, C(2')H), 4.12-4.20 (*m*, 1H,

C(3')H), 3.87 (*d*, $^3J = 8.0$ Hz, 1H, C(4')H), 3.77-3.81 (*m*, 1H, C(5')H), 3.57-3.61 (*m*, 1H, C(5')H), 2.19 (*dt*, $^3J = 6.7$ Hz, $^4J = 3.3$ Hz, 2H, CH₂CCH), 2.75 (*t*, $^4J = 3.3$ Hz, 1H, CCH), 2.37 (*t*, $^3J = 6.7$ Hz, 2H, CCH₂), 1.53-1.59 (*m*, 4H, CH₂); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO, ppm): $\delta = 161.8$ (C4), 149.3 (C2), 142.6 (C6), 98.8 (C5), 93.6 (*d*, $^1J = 185.2$ Hz, C2'), 92.8, 87.4 (*d*, $^2J = 34.2$ Hz, C1'), 84.3, 83.1 (C5'), 72.9 (CCH), 71.3 (CCH), 66.9 (*d*, $^2J = 16.3$ Hz, C3'), 58.8 (C4'), 27.2 (CH₂), 27.0 (CH₂), 18.3 (CCCH₂), 17.2 (CH₂CCH); HRMS (ESI): berechnet für C₁₇H₂₀FN₂O₅⁺ [M+H]⁺: 351.1351, gefunden: 351.1351; FT-IR (ATR, cm⁻¹): 3346 (*m*), 3289 (*m*), 3061 (*w*), 2941 (*w*), 2864 (*w*), 2829 (*w*), 1653 (*s*), 1458 (*m*), 1430 (*m*), 1391 (*m*), 1351 (*w*), 1328 (*w*), 1278 (*s*), 1217 (*w*), 1098 (*s*), 1063 (*s*), 988 (*w*), 949 (*w*), 893 (*w*), 865 (*w*), 775 (*w*), 758 (*w*), 732 (*m*).

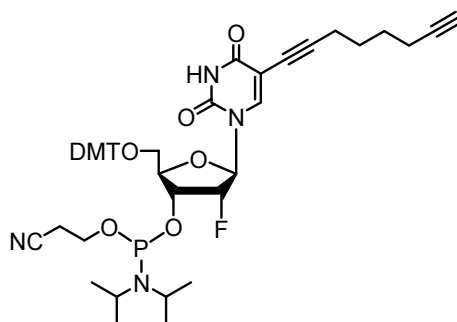
7.2.1.18 5-(Octa-1,7-diinyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxy-2'-fluoro-uridin (**14**)



5-(Okta-1,7-diinyl)-2'-desoxy-2'-fluoro-uridin (**13**) (4.1 g, 11.7 mmol, 1.0 Äq.) wurde mit DMAP (143 mg, 1.17 mmol, 0.1 Äq.) in trockenem Pyridin (40 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von Dimethoxytritylchlorid (5.95 g, 17.6 mmol, 1.5 Äq.) über einen Zeitraum von 2 h in drei äquivalenten Portionen wurde 1 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von MeOH (2 mL) wurde das Reaktionsgemisch eingeeengt und mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (DCM:MeOH:NEt₃, 100:1:1 → DCM:MeOH:NEt₃, 80:1:1). Man erhielt 5-(Octa-1,7-diinyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxy-2'-fluoro-uridin (**14**) als farblosen Feststoff (6.21 g, 9.5 mmol, 81 %).

R_f = 0.34 (DCM:MeOH:NEt₃, 100:1:1); ¹H-NMR (600 MHz, DMSO, ppm): $\delta = 11.69$ (*bs*, 1H, NH), 7.90 (*s*, 1H, C(6)H), 7.39-7.45 (*m*, 2H, ArH), 7.27-7.33 (*m*, 6H, ArH), 7.20-7.25 (*m*, 1H, ArH), 6.85-6.89 (*m*, 4H, ArH), 5.83 (*d*, $^3J = 19.4$ Hz, C(1')H), 5.66 (*d*, $^3J = 7.0$ Hz, 1H, C(3')OH), 5.15 (*dd*, $^2J = 53.3$ Hz, $^3J = 5.0$ Hz, 1H, C(2')H), 4.31-4.43 (*m*, 1H, C(3')H), 4.00-4.05 (*m*, 1H, C(4')H), 3.74 (*s*, 6H, CH₃O), 3.21-3.32 (*m*, 2H, C(5')H), 2.75 (*t*, $^4J = 2.7$ Hz, 1H, CCCH), 2.04-2.13 (*m*, 4H, CH₂CC), 1.29-1.45 (*m*, 4H, CH₂); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO, ppm): $\delta = 161.9$, 158.1 (C4), 149.6, 149.2 (C2), 144.7, 142.4 (C6), 135.5 (C(Ar)H), 135.3 (C(Ar)H), 129.7 (C(Ar)H), 127.6 (C(Ar)H), 126.6 (C(Ar)H), 113.2 (C(Ar)H), 99.1 (C5), 93.2 (*d*, $^1J = 183.5$ Hz, C2'), 93.1, 88.6 (*d*, $^2J = 35.4$ Hz, C1'), 85.7, 84.2 (Cq(DMT)), 81.3 (C4'), 72.4 (CCH), 71.3 (CCH), 67.8 (*d*, $^3J = 16.4$ Hz, C3'), 61.9 (C5'), 27.1 (CH₂), 55.0 (CH₃O), 27.0 (CH₂), 18.0 (CCCH₂), 17.2 (CH₂CCH); HRMS (ESI): berechnet für C₃₈H₃₆FN₂O₇⁻ [M-H]⁻: 651.2512, gefunden: 651.2511; FT-IR (ATR, cm⁻¹): 2934 (*w*), 2365 (*s*), 2339 (*s*), 1684 (*s*), 1606 (*m*), 1507 (*s*), 1456 (*m*), 1278 (*m*), 1247 (*s*), 1175 (*s*), 1103 (*s*), 1032 (*s*), 901 (*w*), 826 (*s*), 790 (*w*), 776 (*m*), 755 (*m*), 701 (*m*), 668 (*s*).

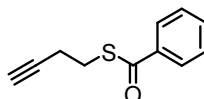
7.2.1.19 5-(Octa-1,7-diinyl)-3'-O-[(2-cyanoethoxy)(diisopropylamino)-phosphono]]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxy-2'-fluoro-uridin (**7**)



5-(Octa-1,7-diinyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxy-2'-fluoro-uridin (**14**) (500 mg, 766 μmol , 1.0 Äq.) wurde in trockenem Dichlormethan (7 mL) unter Argon gelöst und mit DIPEA (495 mg, 3.83 mmol, 6.0 Äq.) versetzt. Nach Zugabe von 2-Cyanoethoxy-*N,N'*-diisopropylchlorophosphoramidit (725 mg, 3.06 mmol, 4.0 Äq.) wurde 3 h bei RT gerührt und anschließend mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (DCM:MeOH:NEt₃, 100:1:1). Man erhielt 5-(Octa-1,7-diinyl)-3'-O-[(2-cyanoethoxy)(diisopropylamino)-phosphono]]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxy-2'-fluoro-uridin (**7**) als farblosen Feststoff (605 mg, 709 μmol , 93 %).

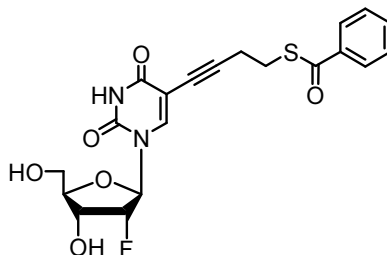
R_f = 0.36 (DCM:MeOH:NEt₃, 100:5:1); ¹³P-NMR (81 MHz, CD₂Cl₂, ppm): δ = 151.5, 150.9; HRMS (ESI): berechnet für C₄₇H₅₃FN₄O₈P⁻ [M-H]⁻: 851.3591, gefunden: 851.3585.

7.2.1.20 But-3-ynylbenzothioat (**15**)



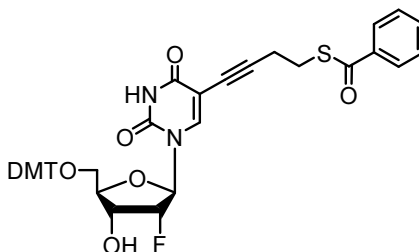
Triphenylphosphin (15.2 g, 75.0 mmol, 1.5 Äq.) wurde in trockenem THF (200 mL) unter Stickstoff gelöst, auf 0 °C abgekühlt und tropfenweise DIAD (14.7 mL, 75.0 mmol, 1.5 Äq.) zugesetzt. Butinol (3.50 g, 50.0 mmol, 1.0 Äq.) und Thiobenzoesäure (8.0 mL, 68.5 mmol, 1.4 Äq.) wurden in trockenem THF (100 mL) unter Stickstoff gelöst und über 30 min zum Reaktionsgemisch getropft. Nach 60 h Rühren bei RT wurde Methanol (5 mL) zugegeben. Einengen und Aufreinigen mittels Säulenchromatographie (*i*Hex:EtOAc, 100:0 -> 50:1) lieferte But-3-ynylbenzothioat (**15**) als farbloses Öl (7.13 g, 37.5 mmol, 75 %).

R_f = 0.55 (*i*Hex:EtOAc, 10:1); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 7.96-8.02 (*m*, 2H, ArH), 7.54-7.62 (*m*, 1H, ArH), 7.42-7.50 (*m*, 2H, ArH), 3.26 (*t*, ³*J* = 7.1 Hz, 2H, SCH₂), 2.60 (*dt*, ³*J* = 7.1 Hz, ⁴*J* = 2.6 Hz, 2H, SCH₂CH₂), 2.07 (*t*, ⁴*J* = 2.6 Hz, 1H, CCH); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 191.3, 136.8 (C(Ar)H), 133.6 (2C, C(Ar)H), 128.3 (C(Ar)H), 127.2 (2C, C(Ar)H), 82.1 (CCH), 69.5 (CCH), 28.0 (SCH₂), 19.6 (SCH₂CH₂); HRMS (EI): berechnet für C₁₁H₉OS⁻ [M-H]⁻: 189.0380, gefunden: 189.0376; FT-IR (ATR, cm⁻¹): 1658 (*s*), 1596 (*w*), 1581 (*w*), 1489 (*w*), 1448 (*m*), 1427 (*w*), 1406 (*w*), 1314 (*w*), 1285 (*w*), 1205 (*s*), 1175 (*m*), 1099 (*w*), 1076 (*w*), 1026 (*w*), 1000 (*w*), 966 (*w*), 905 (*s*), 846 (*w*), 772 (*m*), 686 (*s*).

7.2.1.21 5-(But-3-ynylthiobenzoyl)-2'-desoxy-2'-fluoro-uridin (18**)**

2'-Desoxy-2'-fluoro-5-iodo-uridin (**10**) (2.40 g, 6.45 mmol, 1.0 Äq.) wurde mit CuI (0.49 g, 2.58 mmol, 0.4 Äq.) und PdCl₂(PPh₃)₂ (0.91 g, 1.29 mmol, 0.2 Äq.) in trockenem DMF (60 mL) unter Stickstoff gelöst und mit DIPEA (5.5 mL, 32.3 mmol, 5.0 Äq.) versetzt. Das Reaktionsgefäß wurde nach 10 min Rühren bei RT abgedunkelt und But-3-ynylbenzothioat (**15**) (2.45 g, 12.9 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben. Nach 16 h bei 40 °C wurde das Reaktionsgemisch eingeeengt und mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (DCM:MeOH, 100:1 -> DCM:MeOH, 15:1). Man erhielt 5-(But-3-ynylthiobenzoyl)-2'-desoxy-2'-fluoro-uridin (**18**) als braunen Feststoff (888 mg, 2.05 mmol, 32 %).

R_f = 0.29 (DCM:MeOH, 10:1); ¹H-NMR (600 MHz, DMSO, ppm): δ = 11.64 (*bs*, 1H, NH), 8.28 (*s*, 1H, C(6)H), 7.89-7.93 (*m*, 2H, ArH), 7.66-7.71 (*m*, 1H, ArH), 7.54-7.58 (*m*, 2H, ArH), 5.84 (*dd*, ³J = 17.1 Hz, ³J = 1.4 Hz, 1H, C(1')H), 5.58 (*d*, ³J = 6.5 Hz, 1H, C(3')OH), 5.32 (*t*, ³J = 4.8 Hz, 1H, C(5')OH), 5.02 (*ddd*, ²J = 53.3 Hz, ³J = 4.3 Hz, ³J = 1.4 Hz, 1H, C(2')H), 4.09-4.20 (*m*, 1H, C(3'(H))), 3.74-3.90 (*m*, 2H, C(5')H), 3.53-3.65 (*m*, 1H, C(4')H), 3.20 (*t*, ³J = 7.2 Hz, 2H, SCH₂), 2.71 (*t*, ³J = 7.2 Hz, 2H, SCH₂CH₂); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO, ppm): δ = 191.3 (SCO), 162.2, 149.7, 143.6 (C6), 136.7 (C(Ar)H), 134.4 (C(Ar)H), 129.6 (2C, C(Ar)H), 127.3 (2C, C(Ar)H), 98.8 (C5), 94.0 (*d*, ¹J = 185.4 Hz, C2'), 91.3 (CC), 88.0 (*d*, ²J = 34.3 Hz, C1'), 83.6 (C5'), 74.4 (CC), 67.3 (*d*, ²J = 16.2 Hz, C3'), 59.2 (C4'), 28.1 (SCH₂), 20.3 (SCH₂CH₂); HRMS (ESI): berechnet für C₂₀H₁₈FN₂O₆S⁻ [M-H]⁻: 433.0948, gefunden: 433.0947; FT-IR (ATR, cm⁻¹): 1681 (*s*), 1661 (*s*), 1622 (*m*), 1579 (*s*), 1458 (*m*), 1448 (*m*), 1423 (*m*), 1400 (*m*), 1392 (*m*), 1323 (*w*), 1277 (*m*), 1206 (*m*), 1176 (*m*), 1129 (*w*), 1096 (*s*), 1064 (*m*), 1035 (*m*), 950 (*w*), 910 (*s*), 775 (*m*), 731 (*s*), 689 (*s*), 664 (*w*).

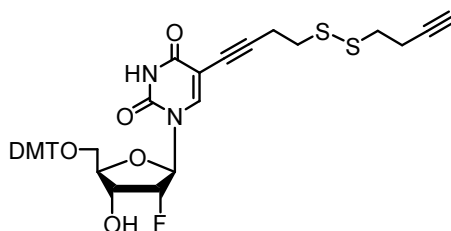
7.2.1.22 5-(But-3-ynylthiobenzoyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxy-2'-fluoro-uridin (20**)**

5-(But-3-ynylthiobenzoyl)-2'-desoxy-2'-fluoro-uridin (**18**) (2.72 g, 6.25 mmol, 1.0 Äq.) und DMAP (76 mg, 630 µmol, 0.1 Äq.) wurden in trockenem Pyridin (80 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von Dimethoxytritylchlorid (3.18 g, 9.37 mmol, 1.5 Äq.) über einen Zeitraum von 2 h in drei äquivalenten Portionen wurde 1 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von Methanol (2 mL) wurde das Re-

aktionsgemisch eingengt und mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (DCM:MeOH:NEt₃, 100:1:1-> 60:1:1). Man erhielt 5-(But-3-ynylthiobenzoyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxy-2'-fluoro-uridin (**20**) als hellbraunen Feststoff (3.47 g, 4.71 mmol, 75 %).

R_f = 0.35 (DCM:MeOH:NEt₃, 100:5:1); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO, ppm): δ = 7.92 (s, 1H, C(6)H), 7.86 (dd, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, 2H, ArH), 7.62-7.69 (m, 1H, ArH), 7.51 (t, ³J = 7.8 Hz, 2H, ArH), 7.39 (d, ³J = 7.2 Hz, 2H, ArH), 7.23-7.30 (m, 6H, ArH), 7.18 (t, ³J = 7.2 Hz, 1H, ArH), 6.85 (d, ³J = 8.9 Hz, 4H, ArH), 5.80 (d, ³J = 19.0 Hz, 1H, C(1')H), 5.65 (s, 1H, C(3')OH), 5.11 (dd, ²J = 53.4 Hz, ³J = 4.7 Hz, 1H, C(2')H), 4.35 (d, ³J = 23.0 Hz, 1H, C(3')H), 4.00 (dd, ³J = 8.6 Hz, ³J = 2.6 Hz, 1H, C(4')H), 3.69 (s, 6H, OCH₃), 3.18-3.30 (m, 2H, C(5')H), 2.77-2.98 (m, 2H, SCH₂), 2.45-2.32 (m, 2H, SCH₂CH₂); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO, ppm): δ = 191.1 (SCO), 162.2, 158.5, 149.6 (C(Ar)H), 145.2 (C(Ar)H), 143.4 (C6H), 136.6 (C(Ar)H), 136.0 (C(Ar)H), 135.7 (C(Ar)H), 134.4 (C(Ar)H), 130.1 (C(Ar)H), 129.5 (2C, ArC), 128.3 (C(Ar)H), 128.0 (C(Ar)H), 127.2 (2C, C(Ar)H), 113.7 (C(Ar)H), 99.1 (C5), 93.7 (d, ¹J = 185.0 Hz, C2'), 91.5 (AlkinC), 89.3 (d, ²J = 36.0 Hz, C1'), 86.1 (Cq(DMT)), 81.7 (C4'), 73.9 (CC), 68.2 (d, ²J = 16.3 Hz, C3), 62.3 (C5), 45.9 (OCH₃), 27.7 (SCH₂), 20.2 (SCH₂CH₂); HRMS (ESI): berechnet für C₄₁H₃₆FN₂O₈S⁻ [M-H]⁻: 736.2255, gefunden: 736.2258; FT-IR (ATR, cm⁻¹): 1700 (m), 1658 (m), 1606 (m), 1580 (w), 1508 (m), 1474 (m), 1445 (m), 1397 (m), 1383 (w), 1300 (w), 1279 (m), 1248 (m), 1205 (m), 1173 (s), 1104 (m), 1071 (m), 1034 (s), 968 (w), 910 (s), 826 (m), 808 (m), 774 (m), 756 (m), 726 (w), 688 (s).

7.2.1.23 5-[1,2-Di(but-3-ynyl)disulfanyl]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxy-2'-fluoro-uridin (**19**)

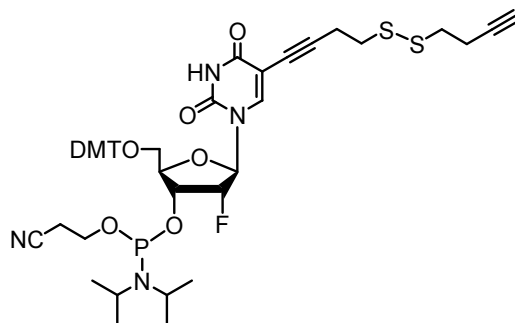


5-(But-3-ynylthiobenzoyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxy-2'-fluoro-uridin (**20**) (2.0 g, 2.7 mmol, 1.0 Äq.) wurde zusammen mit But-3-ynylbenzothioat (**15**) (5.2 g, 27.0 mmol, 10.0 Äq.) in einer NH₃/MeOH-Lösung (7 N, 20 mL) unter Argon gelöst und 16 h bei RT gerührt. Nach portionsweiser Zugabe von Iod bis zu einer konstanten Violettfärbung wurde das Reaktionsgemisch mit EtOAc (200 mL) verdünnt und anschließend dreimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (100 mL) ausgeschüttelt. Nach Trocknen über MgSO₄ wurde das Reaktionsgemisch eingengt und mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (EtOAc:DCM:iHex+NEt₃, 6:3:1+1 %). Man erhielt 5-[1,2-Di(but-3-ynyl)disulfanyl]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxy-2'-fluoro-uridin (**19**) als hellgelben Feststoff (709 mg, 989 μmol, 37 %).

R_f = 0.47 (DCM:MeOH+NEt₃, 10:1+1 %); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO, ppm): δ = 7.93 (s, 1H, C(6)H), 7.37-7.45 (m, 2H, ArH), 7.24-7.32 (m, 6H, ArH), 7.18-7.24 (m, 1H, ArH), 6.83-6.92 (m, 4H, ArH), 5.81 (dd, ³J = 19.0 Hz, ³J = 0.9 Hz, 1H, C(1')H), 5.65 (d, ³J = 6.8 Hz, 1H, C(3')OH), 5.12 (dd, ²J = 52.8 Hz, ³J = 4.7 Hz, 1H, C(2')H), 4.33-4.42 (m, 1H, C(3')H), 3.98-4.03 (m, 1H, C(4')H), 3.72 (s, 6H, OCH₃), 3.23-3.27 (m, 2H, C(5')H), 2.86 (t, ³J = 2.6 Hz, 1H, CCH), 2.75 (t, ³J = 7.2 Hz, 4H, SCH₂), 2.32-2.48 (m, 4H, SCH₂CH₂); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO, ppm): δ = 162.2, 158.5, 149.6, 145.1 (C(Ar)H), 143.1 (C6), 136.0 (C(Ar)H), 135.8 (C(Ar)H), 130.1 (C(Ar)H), 127.9 (C(Ar)H), 113.7 (C(Ar)H), 99.1 (C5), 93.8 (d, ³J = 184.8 Hz, C2'), 91.5 (CC), 89.3 (d, ²J = 35.0 Hz, C1'), 86.1 (Cq(DMT)), 82.9 (AlkinC), 81.7 (C4'), 73.8

(CCH), 72.8 (CCH), 68.1 (*d*, $^2J = 16.9$ Hz, C3'), 62.1 (C5'), 46.0 (OCH₃), 36.9 (SCH₂), 36.4 (SCH₂), 19.8 (CH₂CH₂S), 18.6 (SCH₂CH₂); HRMS (ESI): berechnet für C₃₈H₃₇ClFN₂O₇S₂ [M+Cl]⁻: 716.2026, gefunden: 716.2024; FT-IR (ATR, cm⁻¹): 1657 (*s*), 1624 (*s*), 1618 (*m*), 1578 (*m*), 1509 (*w*), 1462 (*m*), 1447(*m*), 1397 (*s*), 1364 (*m*), 1299 (*w*), 1281 (*w*), 1249 (*w*), 1185 (*w*), 1165 (*m*), 1144 (*m*), 1122 (*m*), 1073 (*w*), 1033 (*m*), 1026 (*m*), 925 (*w*), 846 (*w*), 808 (*m*), 789 (*m*), 771 (*m*), 706 (*m*), 684 (*m*).

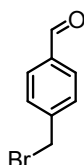
7.2.1.24 5-[1,2-Di(but-3-ynyl)disulfanyl]-3'-O-[(2-cyanoethoxy)-(diisopropylamino)-phosphono]]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxy-2'-fluoro-uridin (8)



Unter Argon wurde 5-[1,2-Di(but-3-ynyl)disulfanyl]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxy-2'-fluoro-uridin (**19**) (320 mg, 446 μ mol, 1.0 Äq.) in trockenem Dichlormethan (4 mL) gelöst und mit DIPEA (456 μ L, 2.68 mmol, 6.0 Äq.) versetzt. Nach Zugabe von 2-Cyanoethoxy-*N,N'*-diisopropylchlorophosphoramidit (423 mg, 1.79 mmol, 4.0 Äq.) wurde 3 h bei RT gerührt und anschließend mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (DCM:MeOH:NEt₃, 100:1:1). Man erhielt 5-[1,2-Di(but-3-ynyl)disulfanyl]-3'-O-[(2-cyanoethoxy)-(diisopropylamino)-phosphono]]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxy-2'-fluoro-uridin (**8**) als hellgelben Feststoff (334 mg, 364 μ mol, 82 %).

$R_f = 0.35$ (DCM:MeOH:NEt₃, 100:5:1); ¹³P-NMR (81 MHz, CD₂Cl₂, ppm): $\delta = 152.2, 151.8$; HRMS (ESI): berechnet für C₄₇H₅₃FN₄O₈PS₂⁻ [M-H]⁻: 915.3032, gefunden: 915.3033.

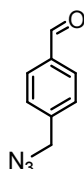
7.2.1.25 Synthese von 4-(Brommethyl)benzaldehyd (36)^[250]



4-(Bromomethyl)benzonitril (12.04 g, 61.39 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem Toluol (120 mL) unter Stickstoff gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Zu der Reaktionsmischung wurde DibalH (86 mL, 86.0 mmol, 1.4 Äq.) getropft und 2 h bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von verdünnter Salzsäure (10 %, 400 mL) wurde zweimal mit Chloroform (30 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen anschließend zweimal mit Wasser (50 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (50 mL) gewaschen. Trocknen über MgSO₄ und Aufreinigen mittels Säulenchromatographie (DCM:*i*Hex, 3:7) lieferte 4-(Bromomethyl)benzaldehyd (**36**) als farblosen Feststoff (10.17 g, 51.09 mmol, 83 %).

$R_f = 0.28$ (*i*Hex/DCM, 1:1); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta = 9.99$ (s, 1H, CHO), 7.84 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H, PhH), 7.53 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H, PhH), 4.49 (s, 2H, CH_2); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta = 191.1$ (CH, 2C), 144.4, 136.3, 130.3 (CH, 2C), 129.8 (CHO), 32.1 (CH_2); HRMS (EI): berechnet für $\text{C}_8\text{H}_7\text{BrO}^+ [\text{M}]^+$: 197.9675, gefunden: 197.9684; FT-IR (ATR, cm^{-1}): 3031 (w), 2842 (w), 2751 (w), 1705 (m), 1682 (s), 1603 (s), 1576 (m), 1425 (w), 1391 (m), 1303 (m), 1227 (m), 1209 (s), 1199 (m), 1163 (m), 1093 (w), 881 (w), 852 (w), 831 (m), 770 (s), 726 (m).

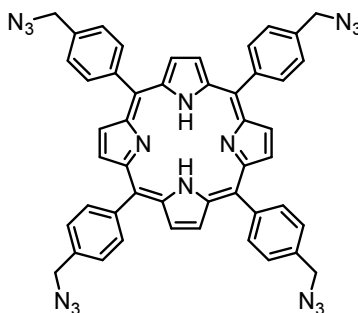
7.2.1.26 4-(Azidomethyl)benzaldehyd (**37**)^[250]



4-(Bromomethyl)benzaldehyd (**36**) (5.01 g, 53.84 mmol, 1.0 Äq.) und Natriumazid (3.50 g, 53.84 mmol, 1.0 Äq.) wurden in Aceton:Wasser (3:1, 80 mL) gelöst und 20 h unter Rückfluss bei 70 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zweimal mit Ether (20 mL) ausgeschüttelt und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (30 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (30 mL) gewaschen. Trocknen über MgSO_4 und Aufreinigen mittels Säulenchromatographie (*i*Hex:EtOAc, 20:1) lieferte 4-(Azidomethyl)benzaldehyd (**37**) als farblose Flüssigkeit (2.75 g, 17.06 mmol, 68 %).

$R_f = 0.29$ (*i*Hex:AcOEt, 1:1); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta = 9.99$ (s, 1H, CHO), 7.87 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H, PhH), 7.46 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H, PhH), 4.42 (s, 2H, CH_2); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta = 191.6$ (CH, 2C), 142.1, 136.1, 130.2 (CH, 2C), 128.4 (CHO), 54.2 (CH_2); HRMS (EI): berechnet für $\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_3\text{O}^+ [\text{M}]^+$: 161.0584, gefunden: 161.0573; FT-IR (ATR, cm^{-1}): 3375 (vw), 3052 (vw), 2931 (vw), 2831 (w), 2740 (w), 2094 (vs), 1694 (vs), 1607 (s), 1578 (m), 1423 (w), 1388 (w), 1344 (w), 1304 (m), 1207 (s), 1167 (s), 1016 (w), 913 (w), 885 (w), 848 (w), 812 (m), 773 (m), 724 (w), 667 (w).

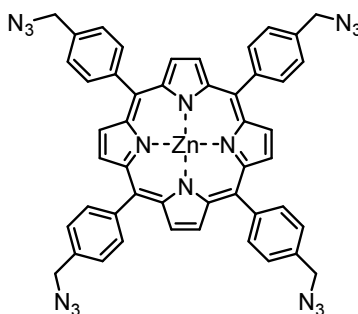
7.2.1.27 5,10,15,20-Tetra(4-azidomethylphenyl)porphyrin (**38**)^[250]



4-(Azidomethyl)benzaldehyd (**37**) (2.61 g, 16.20 mmol, 1.0 Äq.) und frisch destilliertes Pyrrol (1.16 g, 17.29 mmol, 1.1 Äq.) wurden in Propionsäure (60 mL) unter Lichtausschluss gelöst und 30 min bei 120 °C unter Rückfluss gerührt. Nach Erkalten der Reaktionslösung wurde der Niederschlag abfiltriert und mit Methanol (20 mL) gewaschen. Säulenchromatographie (DCM) lieferte 5,10,15,20-Tetra(4-azidomethylphenyl)porphyrin (**38**) als violette Kristalle (316 mg, 380 μmol , 9 %).

$R_f = 0.80$ (DCM); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta = 8.83$ (s, 8H, PyrH), 8.22 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 8H, PhH), 7.69 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 8H, PhH), 4.70 (s, 8H, CH_2), -2.78 (s, 2H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta = 149.2$ (4C, C(Pyr)), 142.3 (4C, C(Ph)), 135.2 (4C, C(Ph)), 135.0 (8C, C(Ph)H), 131.5 (8C, C(Pyr)H), 126.7 (8C, C(Ph)H), 119.7 (8C, C(Pyr)), 55.0 (4C, CH_2); HRMS (ESI): berechnet für $\text{C}_{48}\text{H}_{35}\text{N}_{16}^+$ $[\text{MH}]^+$: 835.3224, gefunden: 835.3229; FT-IR (ATR, cm^{-1}): 3318 (m), 3027 (w), 2935 (w), 2881 (w), 2705 (w), 2607 (w), 2531 (w), 2088 (vs), 1823 (w), 1608 (w), 1555 (w), 1504 (w), 1471 (m), 1400 (w), 1347 (w), 1238 (m), 1021 (w), 965 (s), 852 (w), 800 (s), 782 (w).

7.2.1.28 [5,10,15,20-Tetra(4-azidomethylphenyl)porphyrin]-Zn(II) (**32**)^[250]



5,10,15,20-Tetra(4-azidomethylphenyl)porphyrin (**38**) (52 mg, 62.28 μmol , 1.0 Äq.) und Zinkacetat (134 mg, 610.5 μmol , 9.8 Äq.) wurden in DCM:MeOH (3:1, 60 mL) gelöst und für 2 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde eingeeengt, in Dichlormethan (20 mL) aufgenommen und durch Kieselgur filtriert. Einengen des Filtrats am Rotationsverdampfer lieferte [5,10,15,20-Tetra(4-azidomethylphenyl)porphyrin]-Zn(II) (**32**) als violette Kristalle (52 mg, 57.89 μmol , 93 %).

$R_f = 0.60$ (DCM); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO, ppm): $\delta = 8.77$ (s, 8H, PyrH), 8.19 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 8H, PhH), 7.75 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 8H, PhH), 4.83 (s, 8H, CH_2); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO, ppm): $\delta = 149.1$ (4C, C(Pyr)), 142.4 (4C, C(Ph)), 134.8 (4C, C(Ph)), 134.4 (8C, C(Ph)H), 131.6 (8C, C(Pyr)H), 126.5 (8C, C(Ph)H), 119.9 (8C, C(Pyr)), 53.6 (4C, CH_2); HRMS (ESI): berechnet für $\text{C}_{48}\text{H}_{32}\text{ClN}_{16}\text{Zn}^-$ $[\text{M}+\text{Cl}]^-$: 931.1981, gefunden: 931.1974; FT-IR (ATR, cm^{-1}): 3100 (vw), 3025 (w), 2917 (w), 2546 (w), 2202 (w), 2096 (vs), 1806 (w), 1688 (w), 1609 (w), 1523 (w), 1489 (m), 1441 (w), 1406 (w), 1337 (s), 1280 (m), 1260 (m), 1203 (m), 1179 (m), 1105 (w), 1061 (m), 995 (vs), 857 (w), 786 (s), 716 (m), 660 (w).

7.3 Oligonukleotidsynthese und Click-Modifikation

7.3.1 Festphasensynthese

DNA-Oligonukleotidsynthese erfolgte an einem *Expedite 8900 Nucleic Acid Synthesis System* der Firma *Applied Biosystems* in der Ansatzgröße 1.0 μmol unter Verwendung kommerziell erhältlicher Standard-DNA-Phosphoramidite. Für die Kupplung der kommerziell erhältlichen Amidite wurden die vom Geräte-Hersteller vorgeschlagenen Standardprotokolle benutzt. Für das Sonderamidit und die darauf folgende Base wurde die Kupplungszeit um den Faktor 10 verlängert. Als Festphase wurde ein dT CPG-Träger (500 Å, Glen Research) verwendet. Für die weiteren Lösungen der Festphasensynthese wurden folgende Zusammensetzungen und Konzentrationen verwendet:

Detritylierung: 3 % Dichloressigsäure in Toluol.

Aktivator: 0.25 M Benzylthiotetrazol (BTT) in Acetonitril.

Capping A: Essigsäureanhydrid:Acetonitril:Wasser:2,6-Lutidin (20:50:30).

Capping B: 16 % N-Methylimidazol in Acetonitril.

Oxidation: 0.025 M Iod in Acetonitril:Wasser:2,6-Lutidin (65:30:6).

RNA-Oligonukleotidsynthese erfolgte an einem *Äkta Oligopilot* der Firma *Amersham Biosciences* in der Ansatzgröße 2.0 µmol unter Verwendung kommerziell erhältlicher 2'-Thiomorpholin-4-carbothioat RNA-Phosphoramiditen (TC RNA-Amidite) sowie 2'-Fluoro-Uridinphosphoramidit und 2'-Fluoro-N-Acetyl-Cytidinphosphoramidit. Für die kommerziell erhältlichen Amidite wurde eine Kupplungszeit von 10 min gewählt. Für das Sonderamidit wurde die Kupplungszeit auf 20 min erhöht. Als Festphase wurde ein dT CPG-Träger (500 Å, Glen Research) verwendet. Für die weiteren Lösungen der Festphasensynthese wurden folgende Zusammensetzungen und Konzentrationen verwendet:

Detritylierung: 3 % Dichloressigsäure in Toluol.

Aktivator: 0.5 M Ethylthiotetrazol (ETT) in Acetonitril.

Capping A: Essigsäureanhydrid:Acetonitril:Wasser:2,6-Lutidin (20:50:30).

Capping B: 16 % N-Methylimidazol in Acetonitril.

Oxidation1: 0.025 M Iod in Acetonitril:Wasser:2,6-Lutidin (65:30:6).

Oxidation2: 0.020 M Iod in Acetonitril:Wasser:2,6-Lutidin (65:30:6).

7.3.2 Entschützung und Aufreinigung von Oligonukleotiden

DNA-Oligonukleotide wurden zunächst am Hochvakuum getrocknet und das CPG-Material anschließend vorsichtig in ein 1.5 mL Eppendorf-Gefäß überführt. Abspaltung der Oligonukleotide vom CPG-Träger und Entschützung der Basen erfolgte durch Schütteln in 25 % NH₃:EtOH (1.0 mL, 3:1) über 20 h bei RT in einem Eppendorf Thermomixer. Die Oligonukleotide wurden durch Zentrifugation (13.400 rpm, 15 min) und anschließendem Abdekantieren vom Trägermaterial separiert. Das Trägermaterial wurde zweimal durch Zugabe von 200 µl Wasser mit anschließendem Vortexen, Zentrifugieren und Abdekantieren gewaschen. Die vereinigten Lösungen wurden an einer *Speedvac RVC 2-25* mit *CT 62-50*-Kompressorkühlfalle der Firma *Christ* eingengt und über einen 0.2 µm Membranfilter filtriert. Die Roholigonukleotide wurden durch analytische *reversed phase*-HPLC untersucht und anschließend mittels semipräparativer *reversed phase*-HPLC aufgereinigt. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels *reversed phase*-HPLC und MALDI-TOF analysiert und die Produktfraktionen anschließend vereinigt (Tabelle 7.1).

RNA-Oligonukleotide wurden am Hochvakuum getrocknet, das CPG-Material über 3 min mit 1.0 mL einer Triethylamin-Lösung (20 % in Acetonitril) versetzt und anschließend dreimal mit 5 mL Acetonitril gewaschen. Für die Abspaltung der Oligonukleotide vom CPG-Träger und Entschützung der Basen wurden anschließend 500 µL einer Ethylendiamin-Lösung (50 % in Toluol) zugeben und für 2 h bei RT inkubiert. Nach zweimaligen Waschen mit je 5 mL Acetonitril wurden die entschützten Oligonukleotide in drei Schritten mit jeweils 500 µL Wasser aus der Kartusche eluiert. Die Roholigonukleotide wurden durch analytische *reversed phase*-HPLC untersucht und anschließend mittels se-

mipräparativer *reversed phase*-HPLC aufgereinigt. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels *reversed phase*-HPLC und MALDI-TOF analysiert und die Produktfraktionen anschließend vereinigt (Tabelle 7.1).

Strang	Sequenz 5' → 3'	m/z (ber.)	m/z (gem.)	HPLC, 45 min [% Puffer B]
ODN01	AEA-T-T-F1	1568.5	1568.1	0-70
ODN06	T-T-F1	1209.0	1209.4	0-70
ODN02	AEA-T-T-T-T-F1	2167.6	2167.5	0-70
ODN07	T-T-T-T-F1	1808.1	1808.8	0-70
ODN03	AEA-T-T-T-T-T-T-F1	2784.7	2786.3	0-70
ODN08	T-T-T-T-T-T-F1	2425.1	2426.8	0-70
ODN04	AEA-T-T-T-T-T-T-T-T-F1	3392.8	3392.9	0-70
ODN08	T-T-T-T-T-T-T-T-F1	3033.2	3032.0	0-70
ODN05	AEA-T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-F1	4000.9	4000.0	0-70
ODN10	T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-F1	3641.3	3643.0	0-70
ORN01	CGT-CGT-CGT-CGT-CGT-CGX-T	5865.0	5866.8	0-30
ODN14	<u>X</u> CG-TCG-TCG-TCG-TCT	4631.8	4633.1	0-40
ODN15	<u>Y</u> CG-TCG-TCG-TCG-TCT	4695.8	4691.3	0-40
ORN06	GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CXT	6926.0	Johannes Harder ^[222]	
ORN07	GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CXT	6615.9	Johannes Harder ^[222]	
ORN08	GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CXT	6607.9	Johannes Harder ^[222]	
ORN04	GUA-GGA-GUA-GUG-AAA-GGC-CXT	6923.0	Johannes Harder ^[222]	
ORN05	GUA-GGA-GUA-GUG-AAA-GGC-CUT	6819.0	Johannes Harder ^[222]	
ORN13	CCA-CUA-CAC-UAU-CGA-GAG-AXT	6749.0	6753.7	0-30
ORN15	CCA-CUA-CAC-UAU-CGA-GAG-AXT	6741.0	6744.8	0-30
ORN16	UCU-CUC-GAU-AGU-GUA-GUG-GXT	6774.9	6774.8	0-30
ORN14	UCU-CUC-GAU-AGU-GUA-GUG-GXT	6772.1	6771.5	0-30
ORN17	UCU-CUC-GAU-AGU-GUA-GUG-GUT	6636.1	6638.5	0-30

Tabelle 7.1: Synthetisierte Oligonukleotide mit den zugehörigen Sequenzen, den berechneten und gemessenen Molekulargewichten (MALDI-TOF) und den HPLC-Gradienten der Aufreinigung. AEA = Anandamid, Fl = Fluorescein, N = Desoxyribonukleosid, *N* = Ribonukleosid, N = 2'-Fluoronukleosid, X = Oktadiinyl-Uridin, X = 2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridin, Y = 2'-Fluoro-Disulfanyloktadiinyl-Uridin.

7.3.3 Click-Modifikation von Oligonukleotiden

Für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Click-Reaktionen an Oligonukleotiden wurde ein modifiziertes Protokoll der Firma *BaseClick* verwendet. Zu einer 2.0 mM Lösung des Oligonukleotids in DMSO:Wasser (1:1) wurden 20 Äquivalente des entsprechenden Azids in Form einer 100 mM Lösung in DMSO:tBuOH (3:1) gegeben. Anschließend wurden 20 Äquivalente an Kupfer(I)bromid in Form einer frisch hergestellten Lösung von Kupfer(I)bromid und TBTA im Molverhältnis 1:2 (50 mM bezogen auf Kupfer(I)bromid in DMSO:tBuOH, (3:1)) zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde durchmischt und 4 h bei 30 °C mit Hilfe eines Thermomixers der Firma *Eppendorf* geschüttelt, wobei

nach 1.5 h erneut 5 Äquiv. Kupfer(I)bromid in der oben erwähnten Form zugegeben wurden. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Reaktion mit 100 µL einer 0.3 M Natriumacetat-Lösung versetzt, weitere 10 min geschüttelt und das Oligonukleotid durch Zugabe von 1.0 mL kaltem Ethanol über 30 min bei -20 °C gefällt. Nach Zentrifugation (13.400 rpm, 15 min) wurde die überstehende Lösung abgenommen, der Rückstand *in vacuo* getrocknet und in 100 µL Puffer A gelöst. Wurde das Oligonukleotid durch ein lipophiles Azid modifiziert, so wurde es anstelle von 100 µL Puffer A in 100 µL Puffer A:Puffer B (1:1) gelöst. Nach erneuter Zentrifugation (13.400 rpm, 5 min) wurde das Oligonukleotid über einen 0.2 µm Membranfilter filtriert und anschließend mittels analytischer *reversed phase* HPLC aufgereinigt, wobei die Fraktionierung unmittelbar hinter dem Detektor erfolgte. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels *reversed phase* HPLC und MALDI-TOF analysiert und die Produktfraktionen anschließend vereinigt (Tabelle 7.2).

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	m/z (ber.)	m/z (gem.)	HPLC, 45 min [% Puffer B]
ODN11+5	CGT-CGT-CGT-CGT-CGT-CGX(+5)T	6369.4	6371.1	0-100
ODN12+5	Fl-CGT-CGT-CGT-CGT-CGT-CGX(+5)T	6402.1	6407.7	0-100
ODN14+5	<u>X</u> (+5)CGT-CGT-CGT-CGT-CT	5136.2	5143.5	0-100
ODN15+5	<u>Y</u> (+5)CGT-CGT-CGT-CGT-CT	5200.1	5202.9	0-100
TPP(ODN16) ₁	32+(XGCAT) ₁	2463.5	2466.7	0-100
TPP(ODN16) ₂	32+(XGCAT) ₂	4030.8	4036.9	0-100
TPP(ODN16) ₃	32+(XGCAT) ₃	5598.1	5606.4	0-100
TPP(ODN15) ₄	32+(XGCAT) ₄	7165.4	7175.4	0-100
ORN01+5	GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CTX(+5)	7094.3	7100.3	0-100
ORN08+5	GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CX(+5)T	7128.3	7135.9	0-100
ORN07+5	GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CX(+5)T	7120.3	7124.2	0-100
ORN07+23	GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CX(+23)T	7249.9	7251.6	0-100
ORN07+21	GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CX(+21)T	7124.7	7123.0	0-100
ORN07+22	GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CX(+22)T	7120.3	7121.5	0-100
ORN07+33	33+(GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CXT) ₃	20520.7	20515.1	0-50
ORN07+32	32+(GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CXT) ₄	27359.9	27382.8	0-50
ORN06+5	GGC-CUU-UCA-CUA-CUC-CUA-CX(+5)T	7112.3	7110.6	0-100
ORN16+5	UCU-CUC-GAU-AGU-GUA-GUG-GX(+5)T	7427.4	7429.3	0-100
ORN16+39	UCU-CUC-GAU-AGU-GUA-GUG-GX(+39)T	7175.5	7171.1	0-30
ORN13+5	CCA-CUA-CAC-UAA-CGA-GAG-AX(+5)T	7256.7	7258.3	0-100
ORN13+23	CCA-CUA-CAC-UAA-CGA-GAG-AX(+23)T	7371.5	7377.2	0-100
ORN13+33	33+(CCA-CUA-CAC-UAA-CGA-GAG-AXT) ₃	20919.5	20918.9	0-70
ORN14+39	UCU-CUC-GAU-AGU-GUA-GUG-GX(+39)T	7021.2	7024.5	0-30

Tabelle 7.2: Click-modifizierte Oligonukleotide mit den zugehörigen Sequenzen, den berechneten und gemessenen Molekulargewichten (MALDI-TOF) und den HPLC-Gradienten der Aufreinigung. Fl = Fluorescein, N = Desoxyribonukleosid, N = Ribonukleosid, N = 2'-Fluoronukleosid, X = Oktadiinyl-Uridin, X = 2'-Fluoro-Oktadiinyl-Uridin, Y = 2'-Fluoro-Disulfanyl-oktadiinyl-Uridin.

7.4 Zell-, mikro- und molekularbiologisches Arbeiten

7.4.1 Zellkultur

Die adhärenenten Zellen RBL-2H3 (*rat basophilic leukemia*, ACC 312) wurden bei der *Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ) kommerziell erworben und in *CELLSTAR*[®] Zellkultur-Flaschen mit 75 cm² Wachstumsfläche (T75) in wassergesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert. Die Zellkulturmedien sowie alle verwendeten Pufferlösungen, Seren und Antibiotika wurden bei *Invitrogen* kommerziell erworben. Als Wachstumsmedium wurde 20 mL RPMI 1640 mit 10 % fötalem Kälberserum und 0.10 % Antibiotikum/Antifungizid verwendet. Bei einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen auf ein Zehntel der Zellzahl subkultiviert. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit 10 mL PBS-Puffer gewaschen und zum Ablösen von der Wachstumsfläche mit 2.0 mL Trypsin/EDTA für 4 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 8 mL RPMI-Medium zur Deaktivierung des Trypsins zugeben. Nach Reduktion der Zellzahl auf ein Zehntel durch Entnahme von 9 mL der Zellsuspension wurden 19 mL RPMI-Medium zugefügt und das Kultivieren im Inkubator fortgesetzt. Für die Bestimmung der Zellzahlkonzentration wurden die adhärenenten wie oben im Text beschrieben mittels Trypsinierung suspendiert und anschließend 20 µL der Zellsuspension mit 80 µL Trypanblau-Lösung versetzt. Nach 2 min wurden 20 µL dieser Suspension in eine Zählkammer (Hämocytometer) überführt und die Zellzahl mit Hilfe eines Mikroskops mit 10er Objektiv bestimmt. Dazu wurden die Zellen viermal innerhalb eines Quadranten der Zählkammer gezählt und anschließend gemittelt. Die Gesamtzahl der Zellen in der Suspension ergab sich nach der Formel:

$$Z \times 5 \times V \times 10^4 = \text{Gesamtzahl der Zellen in der Zellsuspension}$$

Z = Gemittelte Anzahl der Zellen in der Zählkammer.

5 = Verdünnungsfaktor während der Färbung mit Trypanblau.

V = Gesamtvolumen der Zellsuspension.

10^4 = Proportionalitätsfaktor der Zählkammer.

7.4.2 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Die Hybridisierung von DNA und RNA erfolgte in einem *Mastercycler Personal Thermocycler* der Firma *Eppendorf*, wobei zunächst auf 90 °C erhitzt und anschließend mit einem Temperaturgradienten von 1 °C pro Minute auf 4 °C abgekühlt wurde.

7.4.3 Konfokalmikroskopie

Für konfokalmikroskopische Untersuchungen wurden 24 h vor der Transfektion 1×10^5 Zellen in 200 µL pro well in 8-well Platten von *ibidi* mit *ibidiTreat*-Beschichtung ausgesät. Die Experimente wurden in vollständigem Wachstumsmedium als Duplikate durchgeführt. Eine Stunde vor der Transfektion wurde das Medium durch 180 µL frisches Medium ersetzt. Die Fluorescein-markierten Oligonukleotide wurden in PBS-Puffer auf 5 µM angelöst und anschließend 20 µL dieser Stocklösungen auf die Zellen gegeben, um eine finale Konzentration von 500 nM bezogen auf die Oligonukleotide einzustellen. Die Überlebensrate der Zellen wurde durch Zugabe des DNA-Interkalators Propidium-Iodid

mit einer finalen Konzentration von 150 mM untersucht. Die Aufnahme der Oligonukleotide durch die Zellen wurde unter einem *TCS SPE* Spektral-Konfokalmikroskop der Firma *Leica* mit inversem Stativ und einem Inkubator der Firma *PECON* bei 37 °C über einen Zeitraum von 8 h verfolgt. Die Anregung der Fluorophore erfolgte mit Laserlicht der Wellenlänge 488 nm. Die Fluoreszenz von Fluorescein wurde zwischen 500 nm und 550 nm detektiert. Die Fluoreszenz von Propidium-Iodid wurde zwischen 700 nm und 800 nm detektiert. Die Helligkeit sowie der Kontrast der in dieser Arbeit gezeigten Aufnahmen wurden mittels *Adobe Photoshop* bearbeitet.

7.4.4 Amplifizierung des Plasmidvektors psiCHECK™-2

Das bei der Firma *Promega* kommerziell erworbene Plasmid psiCHECK™-2 wurde mittels chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen amplifiziert. Dazu wurden 50 µL der Zellen mit 1 µL Plasmid für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock über 2 sek bei 42 °C wurden die Zellen für weitere 2 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 250 µL auf 42 °C vorgewärmtem SOC-Medium versetzt. Nach dem Abzentrifugieren (1 min, 4.000 rpm) wurde der größte Teil des Überstandes verworfen, das Pellet vorsichtig in 50 µL Restvolumen resuspendiert und auf vorgewärmten LB-Agarplatten ausgestrichen. Zur Selektion enthielten die LB-Agarplatten Carbenicillin. Die LB-Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und bei 4 °C gelagert. Die *E. coli* Zellen wurden anschließend in einer Übernachtskultur bei 37 °C weiter kultiviert. Dazu wurden in einem 13 mL-Kulturröhrchen 4.0 mL LB-Medium vorgelegt und mit einer Kolonie der LB-Agarplatten angeimpft. Zur Selektion des gewünschten Bakterienstammes wurde das Medium mit einer Antibiotikum-Stammlösung (Carbenicillin, 1.000x) versetzt. Zur längerfristigen Lagerung der Bakterienkulturen wurden 250 µL autoklaviertes Glycerin mit 750 µL der gewachsenen Übernachtskultur gut vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und abschließend bei -80 °C gelagert.

LB-Medium-Agar 1,5 % (w/v) Agar-Agar in LB-Medium, nach Autoklavieren: 0,1 % (w/v) Antibiotika-Stammlösung, **LB-Medium** 1.0 % (w/v) Pepton, 0.5 % (w/v) Hefeextrakt, 1.0 % (w/v) NaCl, nach dem Autoklavieren: 0.1 % (w/v) Antibiotika-Stammlösung.

Die Isolation der Plasmid-DNA aus den Zellen erfolgte mit Hilfe des *Plasmid Miniprep Kit GeneJET* von *Fermentas*. Dazu wurden 4.0 mL einer Übernachtskultur über 10 min bei 4.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Lyse der Bakterien wurde das Pellet in 250 µL *Resuspension Solution* resuspendiert und nach Zugabe von 250 µL *Lysis Solution* durch viermaliges Invertieren lysiert. Das klare Lysat wurde durch Zugabe von 350 µL *Neutralization Solution* und erneutem viermaligen Invertieren neutralisiert und das Präzipitat über 5 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde auf eine *GeneJET*-Zentrifugensäule überführt und die Säule für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die gebundene Plasmid-DNA zweimal mit 500 µL *Wash Solution* gewaschen (1 min bei 13.000 rpm) und der Säulendurchfluss verworfen. Die Säule wurde durch Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm getrocknet und die Plasmid-DNA abschließend durch zweiminütiges zentrifugieren bei 13.000 rpm mit 50 µL *Elution Buffer* eluiert.

Zur Restriktion des amplifizierten Plasmids wurde 1.0 µL der Plasmid-Lösung mit 1.0 µL 10xNeBuffer EcoRI, 0.1 µL EcoRI sowie 7.9 µL bidest. Wasser versetzt. Die Mischung wurde 2 h inkubiert und die geschnittene DNA mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte unter Verwendung von einprozentigem Agarosegel mit Ethidiumbromid in einer *Mini Sub-Cell GT MINI* Gelkammer der Firma *BIO-RAD* bei einer konstanten Spannung von 90 V in TAE-Laufpuffer unter

Verwendung des DNA-Massenstandards 1 kb DNA Ladder von *Biolabs*. Die Gel-Dokumentation wurde an einem *IDA Imager* von der Firma *Raytest* durchgeführt. Als Lichtquelle wurde UV-Licht der Wellenlänge 254 nm und zur Detektion ein 605 nm Filter verwendet.

TAE-Laufpuffer pH 8.3, 40 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA, **DNA-Auftragspuffer** 50 % (v/v) Glycerin in TAE-Puffer 0.05 % (w/v) Bromphenolblau, **TAE-Gelpuffer** pH 8.3, 20 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA.

7.4.5 Duales Luciferase Reportersystem

Für die Quantifizierung der RNAi mit Hilfe des Dual-Luciferase Reportersystems wurden 16 h vor der Transfektion 3×10^4 Zellen in 200 μL pro *well* in 96-*well* Platten der Firma *Techno Plastic Products AG* ausgesät und bei 37 °C inkubiert. Die Experimente wurden in vollständigem Wachstumsmedium als Triplikate durchgeführt. 1 h vor der Transfektion wurde das Medium durch 100 μL frisches Medium ersetzt. Die Transfektion des Plasmidvektors psiCHECK™-2 wurde unter Verwendung des Transfektionsreagenzes jetPRIME™ der Firma *Polyplus* in Anlehnung an das Herstellerprotokoll. Das Plasmid wurde in jetPRIME™ Puffer auf 10 ng/ μL verdünnt und durch kurzes Vortexen vermischt. Nach Zugabe von 5 μL jetPRIME™ Reagenz pro Mikrogramm Plasmid wurde durch kurzes Vortexen erneut vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 10 μL dieses Transfektionsmixes pro *well* versetzt, was einer Plasmidmenge von 100 ng entsprach. Nach 4 h Inkubation bei 37 °C wurde das Medium durch 100 μL frisches Medium ersetzt. Die Transfektion von siRNA erfolgte entweder unter Verwendung des Transfektionsreagenzes jetPRIME™ in Anlehnung an das Herstellerprotokoll oder durch direkte Zugabe der siRNA zu den Zellen. Dazu wurde die siRNA in jetPRIME™ Puffer hybridisiert und mit jetPRIME™ Puffer auf die gewünschte Konzentration verdünnt, um anschließend die Zellen mit 10 μL pro *well* zu transfizieren. Im Falle von jetPRIME™-vermittelter Transfektion wurden zuvor 0.1 μL jetPRIME™ Reagenz pro Pikomol siRNA zugegeben und nach kurzem Vortexen für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe der siRNA wurden die Zellen für weitere 48 h bei 37 °C inkubiert.

Die Quantifizierung der RNA-Interferenz wurde mit Hilfe des *Dual-Luciferase® Reporter Assays* der Firma *Promega* durchgeführt. Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 100 μL PBS-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 50 μL passivem Lysispuffer wurden die Zellen über 20 min bei 25 °C in einem Thermoschüttler mit 350 rpm lysiert. Die Lumineszenz-Messungen wurden in einem *Tecan GENios Pro Injection Reader* unter Verwendung von 96-Mikroplatten der Firma *Greiner Bio-One GmbH* durchgeführt. Die Biolumineszenz wurde durch Detektion der Photonen über 1 sek in fünf Intervallen im Abstand von 20 sek gemessen. Nach Vorlage von 50 μL *Luciferase Assay Reagent II* (LAR II) wurden 20 μL des Zelllysats durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren zugegeben und unmittelbar danach die Messung der *Firefly*-Luciferase Aktivität am *Tecan Injection Reader* gestartet. Im Anschluss daran wurden 50 μL *Stop and Glo Reagent* ebenfalls durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren zugegeben und die *Renilla*-Luciferase Aktivität gemessen.

7.4.6 Reverse Transkriptase quantitative *realtime* PCR

Für die Quantifizierung der RNA-Interferenz mit Hilfe des *quantitativer realtime PCR* wurden 24 h vor der Transfektion 6×10^5 Zellen in 2 mL pro *well* in 6-*well* Platten der Firma *Techno Plastic Products AG* ausgesät und bei 37 °C inkubiert. Die Experimente wurden in vollständigem Wachstumsmedium durchgeführt. 1 h vor der Transfektion wurde das Medium durch 2 mL frisches Medium ersetzt. Die Transfektion von siRNA erfolgte entweder unter Verwendung des Transfektionsreagenzes *jetPRIME™* in Anlehnung an das Herstellerprotokoll oder durch direkte Zugabe der siRNA zu den Zellen. Dazu wurde die siRNA in *jetPRIME™*-Puffer hybridisiert und mit *jetPRIME™*-Puffer auf die gewünschte Konzentration verdünnt, um anschließend die Zellen mit 100 µL pro *well* zu transfizieren. Im Falle von *jetPRIME™*-vermittelter Transfektion wurden zuvor 0.1 µL *jetPRIME™* Reagenz pro Pikomol siRNA zugegeben und nach kurzem Vortexen für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe der siRNA wurden die Zellen für weitere 48 h bei 37 °C inkubiert.

Die Isolation der RNA erfolgte unter Verwendung von *Trifast™* der Firma *PEQLAB Biotechnologie GmbH* in Anlehnung an das Herstellerprotokoll. Das Medium wurde gegen 1 mL *Trifast™* ausgetauscht und die Zellen über 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Das Lysat wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 0.2 mL Chloroform ausgeschüttelt. Nach Phasentrennung durch Zentrifugieren über 15 Minuten mit 13.400 rpm wurden 500 µL der wässrigen Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die RNA mit 500 µL Isopropanol über 10 min bei 4 °C gefällt. Nach 15 min Zentrifugation mit 13.400 rpm bei 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit 500 µL Ethanol (70 %) gewaschen. Dazu wurde kurz gevortext und nach 15 min Zentrifugation mit 13.400 rpm bei 4 °C der Überstand verworfen. Nach 20 min Trocknen bei Raumtemperatur wurde das Pellet in 50 µL Wasser (Nuklease-frei) angelöst. Dazu wurde 1 Minute bei 55 °C erwärmt und anschließend mehrmals auf- und abpipettiert.

Der Verdau endogener DNA wurde mit einem *TURBO DNA-free™ Kit* der Firma *Applied Biosystems* in Anlehnung an das Herstellerprotokoll durchgeführt. Dazu wurden 10 µL der RNA-Lösung mit 34 µL Wasser (Nuklease-frei) verdünnt und mit 5 µL *TURBO DNase Puffer* (10x) und 1 µL *TURBO DNase* versetzt. Nach 35 min Inkubation bei 37 °C wurden 5 µL *DNase Inactivation Reagent* zugegeben und weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 5 min Zentrifugieren mit 13400 rpm wurden 40 µL in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Die reverse Transkription der RNA in cDNA wurde mit einem *iScript™ cDNA Synthesis Kit* der Firma *Bio-Rad Laboratories GmbH* in Anlehnung an das Herstellerprotokoll durchgeführt. Dazu wurden 10 µL der RNA-Lösung mit 20 µL Wasser (Nuklease-frei) verdünnt und mit 8 µL *iScript Reaction Mix 5x* und 2 µL *iScript Reverse Transcriptase* versetzt. Die reverse Transkription erfolgte anschließend in einem *Mastercycler Personal Thermocycler* der Firma *Eppendorf*. Protokoll: 5 min bei 25 °C, 1 h bei 42 °C, 5 min bei 85 °C, 5 min bei 4 °C.

Die *quantitative realtime PCR* wurde mit einem *SsoFast™ EvaGreen® Supermix Kit* der Firma *Bio-Rad Laboratories GmbH* durchgeführt. Dazu wurden 8 µL *Primermix* vorgelegt und 2 µL cDNA-Templat und 10 µL *SsoFast EvaGreen Supermix* zugegeben. Sämtliche Messungen wurden als Triplikate an einem *Mastercycler® realplex⁴* der Firma *Eppendorf* durchgeführt. Für den *Primermix* wurden der *forward* Primer und der *reverse* Primer auf eine Konzentration von 100 µM angelöst und anschließend jeweils 5 µL beider Lösungen in 390 µL Wasser (Nuklease-frei) vereinigt. Die verwendeten Primer mit den zugehörigen Sequenzen und den Primereffizienzen sind in Tabelle 7.3 aufgeführt. Die

Primereffizienzen wurden in einer separaten Messung durch eine Verdünnungsreihe bestimmt. Dazu wurde eine PCR mit dem unverdünnten cDNA-Templat und mit den Verdünnungen 1/5 und 1/25 durchgeführt. PCR-Protokoll: 95 °C für 2 min, 40 Zyklen 95 °C für 15 sek - 55 °C für 15 sek - 72 °C für 35 sek. Das SYK mRNA-Level wurde normalisiert auf die mRNA-Level von RNA Polymerase II.

Primer des Zielgens Tyrosinkinase SYK (<i>spleen tyrosine kinase</i>)	
<i>Forward</i>	CGA TGG GCT CTA CCT GCT AC
<i>Reverse</i>	GCG TAG GTG CCG TTA AGT TC
Primereffizienz: 96.2 %	
Primer des <i>housekeeping</i> Gens RNA Polymerase II	
<i>Forward</i>	GCA GGC GAG AGC GTT GAG
<i>Reverse</i>	TGG TAT AAT CAA AAC GGA ACT TC
Primereffizienz: 99.5 %	

Tabelle 7.3: Primersequenzen und Primereffizienzen für quantitative realtime PCR.

Literaturverzeichnis

- [1] a) T. Tuschl, P. D. Zamore, R. Lehmann, D. P. Bartel, P. A. Sharp, *Genes Dev.* **1999**, *13*, 3191-3197; b) P. D. Zamore, T. Tuschl, P. A. Sharp, D. P. Bartel, *Cell* **2000**, *101*, 25-33; c) I. J. Macrae, K. Zhou, F. Li, A. Repic, A. N. Brooks, W. Z. Cande, P. D. Adams, J. A. Doudna, *Science* **2006**, *311*, 195-198; d) H. Zhang, F. A. Kolb, L. Jaskiewicz, E. Westhof, W. Filipowicz, *Cell* **2004**, *118*, 57-68.
- [2] G. Hutvagner, M. J. Simard, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 22-32.
- [3] M. P. Czech, M. Aouadi, G. J. Tesz, *Nat. Rev. Endocrinol.* **2011**, *7*, 473-484.
- [4] K. A. Whitehead, R. Langer, D. G. Anderson, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, *8*, 129-138.
- [5] a) J. J. Lu, R. Langer, J. Chen, *Mol. Pharmaceutics* **2009**, *6*, 763-771; b) A. de Fougères, H. P. Vornlocher, J. Maraganore, J. Lieberman, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 443-453; c) M. Robbins, A. Judge, E. Ambegia, C. Choi, E. Yaworski, L. Palmer, K. McClintock, I. MacLachlan, *Hum. Gene Ther.* **2008**, *19*, 991-999.
- [6] a) D. Peer, J. Lieberman, *Gene Ther.* **2011**, *18*, 1127-1133; b) K. Tiemann, J. J. Rossi, *EMBO Mol. Med.* **2009**, *1*, 142-151; c) D. Castanotto, J. J. Rossi, *Nature* **2009**, *457*, 426-433.
- [7] a) M. Herkenham, A. B. Lynn, B. R. de Costa, E. K. Richfield, *Brain Res.* **1991**, *547*, 267-274; b) B. F. Thomas, X. Wei, B. R. Martin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1992**, *263*, 1383-1390; c) T. M. Westlake, A. C. Howlett, T. I. Bonner, L. A. Matsuda, M. Herkenham, *Neuroscience* **1994**, *63*, 637-652; d) L. A. Matsuda, S. J. Lolait, M. J. Brownstein, A. C. Young, T. I. Bonner, *Nature* **1990**, *346*, 561-564; e) A. B. Lynn, M. Herkenham, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1994**, *268*, 1612-1623; f) S. Munro, K. L. Thomas, M. Abu-Shaar, *Nature* **1993**, *365*, 61-65; g) L. Facci, R. Dal Toso, S. Romanello, A. Buriani, S. D. Skaper, A. Leon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 3376-3380.
- [8] S. J. Galli, A. M. Dvorak, H. F. Dvorak, *Prog. Allergy* **1984**, *34*, 1-141.
- [9] a) F. Rakhshan, T. A. Day, R. D. Blakely, E. L. Barker, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *292*, 960-967; b) E. A. Placzek, Y. Okamoto, N. Ueda, E. L. Barker, *J. Neurochem.* **2008**, *107*, 987-1000; c) L. Thors, J. Eriksson, C. J. Fowler, *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 744-750; d) M. J. McFarland, A. C. Porter, F. R. Rakhshan, D. S. Rawat, R. A. Gibbs, E. L. Barker, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 41991-41997; e) S. O. Jacobsson, C. J. Fowler, *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *132*, 1743-1754; f) T. A. Day, F. Rakhshan, D. G. Deutsch, E. L. Barker, *Mol. Pharmacol.* **2001**, *59*, 1369-1375; g) D. M. Lambert, F. G. DiPaolo, P. Sonveaux, M. Kanyonyo, S. J. Govaerts, E. Hermans, J.-L. Bueb, N. M. Delzenne, E. J. Tschirhart, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1440*, 266-274; h) T. Bisogno, S. Maurelli, D. Melck, L. De Petrocellis, V. Di Marzo, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 3315-3323.
- [10] a) B. R. Wong, E. B. Grossbard, D. G. Payan, E. S. Masuda, *Exp. Opin. Invest. Drugs* **2004**, *13*, 743-762; b) M. Ulanova, F. Duta, L. Puttagunta, A. D. Schreiber, A. D. Befus, *Exp. Opin. Ther. Targets* **2005**, *9*, 901-921.
- [11] T. R. Cech, A. J. Zaug, P. J. Grabowski, *Cell* **1981**, *27*, 487-496.
- [12] C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, *Cell* **1983**, *35*, 849-857.
- [13] a) S. Altman, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1990**, *102*, 735-744; b) T. R. Cech, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1990**, *102*, 745-755.
- [14] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806-811.
- [15] a) E. Bernstein, A. A. Caudy, S. M. Hammond, G. J. Hannon, *Nature* **2001**, *409*, 363-366; b) S. M. Hammond, S. Boettcher, A. A. Caudy, R. Kobayashi, G. J. Hannon, *Science* **2001**, *293*, 1146-1150.
- [16] J. Kurreck, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 1378-1398.
- [17] a) C. C. Mello, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 6985-6994; b) A. Z. Fire, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 6966-6984.
- [18] M. Chatterjee-Kishore, C. P. Miller, *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 1559-1565.
- [19] C. Warnecke, Z. Zaborowska, J. Kurreck, V. A. Erdmann, U. Frei, M. Wiesener, K. U. Eckardt, *FASEB J.* **2004**, *18*, 1462-1464.
- [20] L. Manche, S. R. Green, C. Schmedt, M. B. Mathews, *Mol. Cell Biol.* **1992**, *12*, 5238-5248.
- [21] M. J. Clemens, A. Elia, *J. Interferon Cytokine Res.* **1997**, *17*, 503-524.
- [22] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* **2001**, *411*, 494-498.
- [23] C. F. Bennett, E. E. Swayze, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2010**, *50*, 259-293.
- [24] a) J.-R. Bertrand, M. Pottier, A. Vekris, P. Opolon, A. Maksimenko, C. Malvy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *296*, 1000-1004; b) A. Grünweller, E. Wyszko, B. Bieber, R. Jahnel, V. A. Erdmann, J. Kurreck, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3185-3193.

- [25] G. Hutvagner, P. D. Zamore, *Science* **2002**, 297, 2056-2060.
- [26] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, V. Ambros, *Cell* **1993**, 75, 843-854.
- [27] a) E. Wienholds, R. H. A. Plasterk, *FEBS Lett.* **2005**, 579, 5911-5922; b) V. Ambros, *Nature* **2004**, 431, 350-355; c) B. David P, *Cell* **2004**, 116, 281-297.
- [28] B. P. Lewis, C. B. Burge, D. P. Bartel, *Cell* **2005**, 120, 15-20.
- [29] a) J. S. Parker, D. Barford, *Trends Biochem. Sci.* **2006**, 31, 622-630; b) S. M. Elbashir, W. Lendeckel, T. Tuschl, *Genes Dev.* **2001**, 15, 188-200.
- [30] a) J. G. Doench, C. P. Petersen, P. A. Sharp, *Genes Dev.* **2003**, 17, 438-442; b) Y. Zeng, R. Yi, B. R. Cullen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100, 9779-9784.
- [31] S. Yekta, I.-h. Shih, D. P. Bartel, *Science* **2004**, 304, 594-596.
- [32] S. Saxena, Z. O. Jónsson, A. Dutta, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 44312-44319.
- [33] M. Jinek, J. A. Doudna, *Nature* **2009**, 457, 405-412.
- [34] P. J. Paddison, A. A. Caudy, E. Bernstein, G. J. Hannon, D. S. Conklin, *Genes Dev.* **2002**, 16, 948-958.
- [35] Y. Lee, C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim, V. N. Kim, *Nature* **2003**, 425, 415-419.
- [36] a) M. Landthaler, A. Yalcin, T. Tuschl, *Curr. Biol.* **2004**, 14, 2162-2167; b) R. I. Gregory, K. P. Yan, G. Amuthan, T. Chendrimada, B. Doratotaj, N. Cooch, R. Shiekhattar, *Nature* **2004**, 432, 235-240; c) A. M. Denli, B. B. Tops, R. H. Plasterk, R. F. Ketting, G. J. Hannon, *Nature* **2004**, 432, 231-235; d) J. Han, Y. Lee, K. H. Yeom, Y. K. Kim, H. Jin, V. N. Kim, *Genes Dev.* **2004**, 18, 3016-3027.
- [37] J. Han, Y. Lee, K.-H. Yeom, J.-W. Nam, I. Heo, J.-K. Rhee, S. Y. Sohn, Y. Cho, B.-T. Zhang, V. N. Kim, *Cell* **2006**, 125, 887-901.
- [38] a) E. Lund, S. Güttinger, A. Calado, J. E. Dahlberg, U. Kutay, *Science* **2004**, 303, 95-98; b) M. T. Bohnsack, K. Czaplinski, D. Görlich, *RNA* **2004**, 10, 185-191; c) R. Yi, Y. Qin, I. G. Macara, B. R. Cullen, *Genes Dev.* **2003**, 17, 3011-3016.
- [39] S. W. Knight, B. L. Bass, *Science* **2001**, 293, 2269-2271.
- [40] H. Scott M, *FEBS Lett.* **2005**, 579, 5822-5829.
- [41] R. E. Collins, X. Cheng, *J. Cell. Biochem.* **2006**, 99, 1251-1266.
- [42] J. Blaszczuk, J. E. Tropea, M. Bubunenko, K. M. Routzahn, D. S. Waugh, D. L. Court, X. Ji, *Structure* **2001**, 9, 1225-1236.
- [43] J. W. Gaynor, B. J. Campbell, R. Cosstick, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 4169-4184.
- [44] Y. Tomari, P. D. Zamore, *Genes Dev.* **2005**, 19, 517-529.
- [45] a) C. Matranga, Y. Tomari, C. Shin, D. P. Bartel, P. D. Zamore, *Cell* **2005**, 123, 607-620; b) T. A. Rand, S. Petersen, F. Du, X. Wang, *Cell* **2005**, 123, 621-629.
- [46] a) A. Nykanen, B. Haley, P. D. Zamore, *Cell* **2001**, 107, 309-321; b) S. M. Elbashir, J. Martinez, A. Patkaniowska, W. Lendeckel, T. Tuschl, *EMBO J.* **2001**, 20, 6877-6888.
- [47] a) N. H. Tolia, L. Joshua-Tor, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3, 36-43; b) J. B. Ma, K. Ye, D. J. Patel, *Nature* **2004**, 429, 318-322; c) J. S. Parker, S. M. Roe, D. Barford, *Nature* **2005**, 434, 663-666; d) F. V. Rivas, N. H. Tolia, J.-J. Song, J. P. Aragon, J. Liu, G. J. Hannon, L. Joshua-Tor, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, 12, 340-349.
- [48] S. Weitzer, J. Martinez, *Nature* **2007**, 447, 222-226.
- [49] a) Q. Liu, T. A. Rand, S. Kalidas, F. Du, H. E. Kim, D. P. Smith, X. Wang, *Science* **2003**, 301, 1921-1925; b) Y. Tomari, C. Matranga, B. Haley, N. Martinez, P. D. Zamore, *Science* **2004**, 306, 1377-1380.
- [50] a) A. Khvorova, A. Reynolds, S. D. Jayasena, *Cell* **2003**, 115, 209-216; b) D. S. Schwarz, G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin, P. D. Zamore, *Cell* **2003**, 115, 199-208.
- [51] M. K. Montgomery, S. Xu, A. Fire, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, 95, 15502-15507.
- [52] S. M. Hammond, E. Bernstein, D. Beach, G. J. Hannon, *Nature* **2000**, 404, 293-296.
- [53] a) J. S. Parker, S. M. Roe, D. Barford, *EMBO J.* **2004**, 23, 4727-4737; b) J. J. Song, S. K. Smith, G. J. Hannon, L. Joshua-Tor, *Science* **2004**, 305, 1434-1437.
- [54] J. B. Ma, Y. R. Yuan, G. Meister, Y. Pei, T. Tuschl, D. J. Patel, *Nature* **2005**, 434, 666-670.
- [55] J. J. Song, J. Liu, N. H. Tolia, J. Schneiderman, S. K. Smith, R. A. Martienssen, G. J. Hannon, L. Joshua-Tor, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, 10, 1026-1032.
- [56] Y. Wang, G. Sheng, S. Juranek, T. Tuschl, D. J. Patel, *Nature* **2008**, 456, 209-213.
- [57] I. J. MacRae, E. Ma, M. Zhou, C. V. Robinson, J. A. Doudna, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105, 512-517.
- [58] A. Birmingham, E. M. Anderson, A. Reynolds, D. Ilsley-Tyree, D. Leake, Y. Fedorov, S. Baskerville, E. Maksimova, K. Robinson, J. Karpilow, W. S. Marshall, A. Khvorova, *Nat. Methods* **2006**, 3, 199-204.
- [59] a) D. S. Schwarz, Y. Tomari, P. D. Zamore, *Curr. Biol.* **2004**, 14, 787-791; b) J. Martinez, T. Tuschl, *Genes Dev.* **2004**, 18, 975-980.

- [60] a) R. I. Gregory, T. P. Chendrimada, N. Cooch, R. Shiekhattar, *Cell* **2005**, *123*, 631-640; b) T. P. Chendrimada, R. I. Gregory, E. Kumaraswamy, J. Norman, N. Cooch, K. Nishikura, R. Shiekhattar, *Nature* **2005**, *436*, 740-744; c) K. Förstemann, Y. Tomari, T. Du, V. V. Vagin, A. M. Denli, D. P. Bratu, C. Klattenhoff, W. E. Theurkauf, P. D. Zamore, *PLoS Biol.* **2005**, *3*, e236; d) A. D. Haase, L. Jaskiewicz, H. Zhang, S. Laine, R. Sack, A. Gatignol, W. Filipowicz, *EMBO Rep.* **2005**, *6*, 961-967; e) A. A. Caudy, M. Myers, G. J. Hannon, S. M. Hammond, *Genes Dev.* **2002**, *16*, 2491-2496.
- [61] Y. Wang, S. Juraneck, H. Li, G. Sheng, G. S. Wardle, T. Tuschl, D. J. Patel, *Nature* **2009**, *461*, 754-761.
- [62] a) Y.-L. Chiu, T. M. Rana, *Mol. Cell* **2002**, *10*, 549-561; b) Y.-L. CHIU, T. M. RANA, *RNA* **2003**, *9*, 1034-1048; c) B. Haley, P. D. Zamore, *Nature Structural & Molecular Biology* **2004**, *11*, 599-606; d) M. Amarzguoui, T. Holen, E. Babaie, H. Prydz, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 589-595.
- [63] a) Y. L. Chiu, T. M. Rana, *RNA* **2003**, *9*, 1034-1048; b) T. M. Rana, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 23-36.
- [64] J. M. Layzer, A. P. McCaffrey, A. K. Tanner, Z. Huang, M. A. Kay, B. A. Sullenger, *RNA* **2004**, *10*, 766-771.
- [65] D. A. Braasch, Z. Paroo, A. Constantinescu, G. Ren, O. K. Oz, R. P. Mason, D. R. Corey, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1139-1143.
- [66] J. B. Bramsen, M. B. Laursen, A. F. Nielsen, T. B. Hansen, C. Bus, N. Langkjær, B. R. Babu, T. Højland, M. Abramov, A. Van Aerschot, D. Odadzic, R. Smicius, J. Haas, C. Andree, J. Barman, M. Wenska, P. Srivastava, C. Zhou, D. Honcharenko, S. Hess, E. Müller, G. V. Bobkov, S. N. Mikhailov, E. Fava, T. F. Meyer, J. Chattopadhyaya, M. Zerial, J. W. Engels, P. Herdewijn, J. Wengel, J. Kjems, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 2867-2881.
- [67] a) F. Czauderna, M. Fechtner, S. Dames, H. Aygün, A. Klippel, G. J. Pronk, K. Giese, J. Kaufmann, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 2705-2716; b) D. S. Schwarz, G. Hutvágner, B. Haley, P. D. Zamore, *Mol. Cell* **2002**, *10*, 537-548.
- [68] S. Parrish, J. Fleenor, S. Xu, C. Mello, A. Fire, *Mol. Cell* **2000**, *6*, 1077-1087.
- [69] a) D. A. Braasch, S. Jensen, Y. Liu, K. Kaur, K. Arar, M. A. White, D. R. Corey, *Biochemistry* **2003**, *42*, 7967-7975; b) A. H. S. Hall, J. Wan, E. E. Shaughnessy, B. Ramsay Shaw, K. A. Alexander, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 5991-6000.
- [70] J. Elmén, H. Thonberg, K. Ljungberg, M. Frieden, M. Westergaard, Y. Xu, B. Wahren, Z. Liang, H. Ørum, T. Koch, C. Wahlestedt, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 439-447.
- [71] T. P. Prakash, C. R. Allerson, P. Dande, T. A. Vickers, N. Sioufi, R. Jarres, B. F. Baker, E. E. Swayze, R. H. Griffey, B. Bhat, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4247-4253.
- [72] J. Harborth, S. M. Elbashir, K. Vandenburgh, H. Manninga, S. A. Scaringe, K. Weber, T. Tuschl, *Antisense Nucl. Ac. Drug Dev.* **2003**, *13*, 83-105.
- [73] M. Faria, D. G. Spiller, C. Dubertret, J. S. Nelson, M. R. H. White, D. Scherman, C. Helene, C. Giovannangeli, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 40-44.
- [74] M. Gaglione, A. Messere, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2010**.
- [75] D. H. Kim, J. J. Rossi, *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 173-184.
- [76] a) M. Monaghan, A. Pandit, *Adv Drug Deliv Rev* **2011**, *63*, 197-208; b) A. K. Azkur, B. Kim, S. Suvas, Y. Lee, U. Kumaraguru, B. T. Rouse, *Oligonucleotides* **2005**, *15*, 72-84; c) Y. Yang, Y. Bai, G. Xie, N. Zhang, Y. P. Ma, L. J. Chen, Y. Jiang, X. Zhao, Y. Q. Wei, H. X. Deng, *Cancer Biother. Radiopharm.* **2010**, *25*, 65-73.
- [77] T. R. Brummelkamp, R. Bernards, R. Agami, *Science* **2002**, *296*, 550-553.
- [78] D. Bumcrot, M. Manoharan, V. Kotliansky, D. W. Sah, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 711-719.
- [79] S. Yang, *Trends Genet.* **2003**, *19*, 9-12.
- [80] C. X. Li, A. Parker, E. Menocal, S. Xiang, L. Borodyansky, J. H. Fruehauf, *Cell Cycle* **2006**, *5*, 2103-2109.
- [81] F. Liu, L. Huang, *J. Control. Release* **2002**, *78*, 259-266.
- [82] K. Gao, L. Huang, *Mol. Pharmaceutics* **2008**, *6*, 651-658.
- [83] D. Ferber, *Science* **2001**, *294*, 1638-1642.
- [84] a) M. Ma, L. Zhou, X. Guo, Z. Lv, Y. Yu, C. Ding, P. Zhang, Y. Bi, J. Xie, L. Wang, M. Lin, Z. Zhou, R. Huo, J. Sha, Q. Zhou, *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1793*, 1804-1810; b) S. Bose, G. M. Leclerc, R. Vasquez-Martinez, F. R. Boockfor, *Mol. Cell Endocrinol.* **2010**, *314*, 75-83; c) M. Wiese, K. Castiglione, M. Hensel, U. Schleicher, C. Bogdan, J. Jantsch, *J. Immunol. Methods* **2010**, *353*, 102-110.
- [85] D. L. Lewis, J. A. Wolff, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, *59*, 115-123.
- [86] M. G. Sebestyen, V. G. Budker, T. Budker, V. M. Subbotin, G. Zhang, S. D. Monahan, D. L. Lewis, S. C. Wong, J. E. Hagstrom, J. A. Wolff, *J. Gene Med.* **2006**, *8*, 852-873.
- [87] H. Giladi, M. Ketzinel-Gilad, L. Rivkin, Y. Felig, O. Nussbaum, E. Galun, *Mol. Ther.* **2003**, *8*, 769-776.
- [88] V. Sokolova, M. Epple, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *120*, 1402 - 1416.
- [89] a) N. Toub, J. R. Bertrand, A. Tamaddon, H. Elhames, H. Hillaireau, A. Maksimenko, J. Maccario, C. Malvy, E. Fattal, P. Couvreur, *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 892-900; b) E. M. Pridgen, R. Langer, O. C. Farokhzad, *Nanomedicine* **2007**, *2*, 669-680.

- [90] K. Kataoka, K. Itaka, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, M. Oishi, Y. Nagasaki, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2005**, *49*, 17-18.
- [91] a) A. M. Derfus, A. A. Chen, D.-H. Min, E. Ruoslahti, S. N. Bhatia, *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18*, 1391-1396; b) W. B. Tan, S. Jiang, Y. Zhang, *Biomaterials* **2007**, *28*, 1565-1571.
- [92] D. C. Drummond, O. Meyer, K. Hong, D. B. Kirpotin, D. Papahadjopoulos, *Pharmacol. Rev.* **1999**, *51*, 691-744.
- [93] a) A. V. Kabanov, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2006**, *58*, 1597-1621; b) S. Akhtar, I. Benter, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, *59*, 164-182.
- [94] M. J. Tiera, F. O. Winnik, J. C. Fernandes, *Curr. Gene Ther.* **2006**, *6*, 59-71.
- [95] a) M. Grzelinski, B. Urban-Klein, T. Martens, K. Lamszus, U. Bakowsky, S. Hobel, F. Czubyko, A. Aigner, *Hum. Gene Ther.* **2006**, *17*, 751-766; b) M. Meyer, A. Philipp, R. Oskuee, C. Schmidt, E. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3272-3273; c) H. Kang, R. DeLong, M. Fisher, R. Juliano, *Pharm. Res.* **2005**, *22*, 2099-2106.
- [96] a) O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J. P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 7297-7301; b) B. Abdallah, A. Hassan, C. Benoist, D. Goula, J. P. Behr, B. A. Demeneix, *Hum. Gene Ther.* **1996**, *7*, 1947-1954; c) S.-M. Zou, P. Erbacher, J.-S. Remy, J.-P. Behr, *J. Gene Med.* **2000**, *2*, 128-134.
- [97] M. Neu, D. Fischer, T. Kissel, *J. Gene Med.* **2005**, *7*, 992-1009.
- [98] Y. K. Oh, D. Suh, J. M. Kim, H. G. Choi, K. Shin, J. J. Ko, *Gene Ther.* **2002**, *9*, 1627-1632.
- [99] B. Urban-Klein, S. Werth, S. Abuharbeid, F. Czubyko, A. Aigner, *Gene Ther.* **2004**, *12*, 461-466.
- [100] a) A. Kichler, C. Leborgne, E. Coeytaux, O. Danos, *J. Gene Med.* **2001**, *3*, 135-144; b) N. D. Sonawane, F. C. Szoka, A. S. Verkman, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 44826-44831; c) A. Akinc, M. Thomas, A. M. Klibanov, R. Langer, *J. Gene Med.* **2005**, *7*, 657-663.
- [101] a) L. Wightman, R. Kircheis, V. Rössler, S. Carotta, R. Ruzicka, M. Kurs, E. Wagner, *J. Gene Med.* **2001**, *3*, 362-372; b) S. Werth, B. Urban-Klein, L. Dai, S. Höbel, M. Grzelinski, U. Bakowsky, F. Czubyko, A. Aigner, *J. Controlled Release* **2006**, *112*, 257-270; c) V. Russ, H. Elfberg, C. Thoma, J. Kloeckner, M. Ogris, E. Wagner, *Gene Ther.* **2007**, *15*, 18-29; d) Y. Omid, A. J. Hollins, M. Benboubetra, R. Drayton, I. F. Benter, S. Akhtar, *J. Drug Target* **2003**, *11*, 311-323.
- [102] a) S. Weisman, D. Hirsch-Lerner, Y. Barenholz, Y. Talmon, *Biophys. J.* **2004**, *87*, 609-614; b) L. Desigaux, M. Sainlos, O. Lambert, R. Chevre, E. Letrou-Bonneval, J.-P. Vigneron, P. Lehn, J.-M. Lehn, B. Pitard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 16534-16539; c) N. F. Boussein, C. S. McAllister, K. K. Ewert, C. E. Samuel, C. R. Safinya, *Biochemistry* **2007**, *46*, 4785-4792; d) J. O. Rädler, I. Koltov, T. Salditt, C. R. Safinya, *Science* **1997**, *275*, 810-814; e) A. Schroeder, C. G. Levins, C. Cortez, R. Langer, D. G. Anderson, *J. Intern. Med.* **2010**, *267*, 9-21.
- [103] a) A. Santel, M. Aleku, O. Keil, J. Endruschat, V. Esche, B. Durieux, K. Löffler, M. Fechtner, T. Rohl, G. Fisch, S. Dames, W. Arnold, K. Giese, A. Klippel, J. Kaufmann, *Gene Ther.* **2006**, *13*, 1360-1370; b) J. A. Wolff, D. B. Rozema, *Mol. Ther.* **2007**, *16*, 8-15.
- [104] O. Zelphati, F. C. Szoka, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 11493-11498.
- [105] a) A. D. Judge, V. Sood, J. R. Shaw, D. Fang, K. McClintock, I. MacLachlan, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 457-462; b) H. Lv, S. Zhang, B. Wang, S. Cui, J. Yan, *J. Controlled Release* **2006**, *114*, 100-109; c) R. Kedmi, N. Ben-Arie, D. Peer, *Biomaterials* **2010**, *31*, 6867-6875.
- [106] P. Midoux, G. Breuzard, J. P. Gomez, C. Pichon, *Curr. Gene Ther.* **2008**, *8*, 335-352.
- [107] J. Soutschek, A. Akinc, B. Bramlage, K. Charisse, R. Constien, M. Donoghue, S. Elbashir, A. Geick, P. Hadwiger, J. Harborth, M. John, V. Kesavan, G. Lavine, R. K. Pandey, T. Racie, K. G. Rajeev, I. Rohl, I. Toudjarska, G. Wang, S. Wuschko, D. Bumcrot, V. Kotliansky, S. Limmer, M. Manoharan, H. P. Vornlocher, *Nature* **2004**, *432*, 173-178.
- [108] Y. Huang, J. Hong, S. Zheng, Y. Ding, S. Guo, H. Zhang, X. Zhang, Q. Du, Z. Liang, *Mol. Ther.* **2011**, *19*, 381-385.
- [109] N. Yamazaki, S. Kojima, N. V. Bovin, S. André, S. Gabius, H. J. Gabius, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2000**, *43*, 225-244.
- [110] a) B. Ernst, J. L. Magnani, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, *8*, 661-677; b) H.-J. Gabius, H.-C. Siebert, S. André, J. Jiménez-Barbero, H. Rüdiger, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 740-764; c) R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683-720.
- [111] M. Monsigny, P. Midoux, R. Mayer, A. C. Roche, *Biosci. Rep.* **1999**, *19*, 125-132.
- [112] a) H. Yan, K. Tram, *Glycoconjugate J.* **2007**, *24*, 107-123; b) H. Zhang, Y. Ma, X.-L. Sun, *Med. Res. Rev.* **2010**, *30*, 270-289.

- [113] a) Y. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321-327; b) Y. C. Lee, R. R. Townsend, M. R. Hardy, J. Lonngrén, J. Arnarp, M. Haraldsson, H. Lonn, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 199-202; c) J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555-578.
- [114] a) M. Dubber, J. M. J. Fréchet, *Bioconjug. Chem.* **2002**, *14*, 239-246; b) B. a. Ugarte-Urbe, S. Pérez-Rentero, R. Lucas, A. Aviñó, J. J. Reina, I. Alkorta, R. n. Eritja, J. C. Morales, *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 1280-1287; c) J. C. Morales, J. J. Reina, I. Díaz, A. Aviñó, P. M. Nieto, R. Eritja, *Chem.--Eur. J.* **2008**, *14*, 7828-7835; d) M. A. Maier, C. G. Yannopoulos, N. Mohamed, A. Roland, H. Fritz, V. Mohan, G. Just, M. Manoharan, *Bioconjug. Chem.* **2002**, *14*, 18-29; e) Y. Singh, O. Renaudet, E. Defrancq, P. Dumy, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1359-1362.
- [115] L. Zhu, R. I. Mahato, *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 2119-2127.
- [116] D. B. Rozema, D. L. Lewis, D. H. Wakefield, S. C. Wong, J. J. Klein, P. L. Roesch, S. L. Bertin, T. W. Reppen, Q. Chu, A. V. Blokhin, J. E. Hagstrom, J. A. Wolff, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 12982-12987.
- [117] M. Oishi, Y. Nagasaki, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1624-1625.
- [118] A. Aviñó, S. Ocampo, R. Lucas, J. Reina, J. Morales, J. Perales, R. Eritja, *Mol. Diversity* **2011**, *15*, 751-757.
- [119] F. Staud, M. Nishikawa, Y. Takakura, M. Hashida, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1427*, 183-192.
- [120] a) A. D. Attie, R. C. Pittman, D. Steinberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1980**, *77*, 5923-5927; b) E. A. L. Biessen, D. M. Beuting, H. Vietsch, M. K. Bijsterbosch, T. J. C. Van Berkel, *J. Hepatology* **1994**, *21*, 806-815.
- [121] L. Zhu, Z. Ye, K. Cheng, D. D. Miller, R. I. Mahato, *Bioconjug. Chem.* **2007**, *19*, 290-298.
- [122] a) H. F. Gilbert, in *Methods Enzymol.*, Vol. Volume 251 (Ed.: P. Lester), Academic Press, **1995**, pp. 8-28; b) S. Raina, D. Missiakas, *Annu. Rev. Microbiol.* **1997**, *51*, 179-202.
- [123] M. Manoharan, K. L. Tivel, T. P. Condon, L. K. Andrade, I. Barber-Peoch, G. Inamati, S. Shah, V. Mohan, M. J. Graham, C. F. Bennett, S. T. Crooke, P. D. Cook, *Nucleosid. Nucleotid.* **1997**, *16*, 1129-1138.
- [124] a) H. Jeon, S. C. Blacklow, in *Annu. Rev. Biochem.*, Vol. 74, Annual Reviews, Palo Alto, **2005**, pp. 535-562; b) A. Nykjaer, T. E. Willnow, *Trends Cell Biol.* **2002**, *12*, 273-280; c) A. Patwa, A. Gissot, I. Bestel, P. Barthelemy, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5844-5854.
- [125] C. Lorenz, P. Hadwiger, M. John, H. P. Vornlocher, C. Unverzagt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4975-4977.
- [126] N. S. Petrova, I. V. Chernikov, M. I. Meschaninova, I. S. Dovydenko, A. G. Venyaminova, M. A. Zenkova, V. V. Vlassov, E. L. Chernolovskaya, *Nucleic Acids Res.* **2011**.
- [127] S. L. Hofmann, D. W. Russell, J. L. Goldstein, M. S. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 6312-6316.
- [128] M. DiFiglia, M. Sena-Esteves, K. Chase, E. Sapp, E. Pfister, M. Sass, J. Yoder, P. Reeves, R. K. Pandey, K. G. Rajeev, M. Manoharan, D. W. Y. Sah, P. D. Zamore, N. Aronin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 17204-17209.
- [129] Q. Chen, D. Butler, W. Querbies, R. K. Pandey, P. Ge, M. A. Maier, L. Zhang, K. G. Rajeev, L. Nechev, V. Kotelianski, M. Manoharan, D. W. Y. Sah, *J. Controlled Release* **2010**, *144*, 227-232.
- [130] M. Hällbrink, A. Florén, A. Elmquist, M. Pooga, T. Bartfai, Ü. Langel, *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1515*, 101-109.
- [131] H. Kappus, A. T. Diplock, *Free Radic. Biol. Med.* **1992**, *13*, 55-74.
- [132] C. P. Leamon, P. S. Low, *Drug Discovery Today* **2001**, *6*, 44-51.
- [133] a) N. Parker, M. J. Turk, E. Westrick, J. D. Lewis, P. S. Low, C. P. Leamon, *Anal. Biochem.* **2005**, *338*, 284-293; b) C. Paulos, B. Varghese, W. Widmer, G. Breur, E. Vlashi, P. Low, *Arthritis Res. Ther.* **2006**, *8*, R77.
- [134] C. P. Leamon, P. S. Low, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 5572-5576.
- [135] K. Nishina, T. Unno, Y. Uno, T. Kubodera, T. Kanouchi, H. Mizusawa, T. Yokota, *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 734-740.
- [136] M. Lindgren, M. Hällbrink, A. Prochiantz, Ü. Langel, *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 99-103.
- [137] K. Zhang, Q. Wang, Y. Xie, G. Mor, E. Sega, P. S. Low, Y. Huang, *RNA* **2008**, *14*, 577-583.
- [138] M. Thomas, S. A. Kularatne, L. Qi, P. Kleindl, C. P. Leamon, M. J. Hansen, P. S. Low, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1175*, 32-39.
- [139] J. Willibald, J. Harder, K. Sparrer, K.-K. Conzelmann, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12330-12333.
- [140] C. Dohmen, T. Frohlich, U. Lachelt, I. Rohl, H.-P. Vornlocher, P. Hadwiger, E. Wagner, *Mol. Ther.--Nucleic Acids* **2012**, *1*, 7.
- [141] M. Hansen, K. Kilk, U. Langel, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 572-579.
- [142] R. L. Juliano, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2005**, *7*, 132-136.
- [143] A. Muratovska, M. R. Eccles, *FEBS Lett.* **2004**, *558*, 63-68.
- [144] Y.-L. Chiu, A. Ali, C.-y. Chu, H. Cao, T. M. Rana, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1165-1175.
- [145] G. Cesarone, O. P. Edupuganti, C.-P. Chen, E. Wickstrom, *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18*, 1831-1840.

- [146] M. R. Alam, X. Ming, M. Fisher, J. G. Lackey, K. G. Rajeev, M. Manoharan, R. L. Juliano, *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 1673-1681.
- [147] a) M. Silhol, M. Tyagi, M. Giacca, B. Lebleu, E. Vivès, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 494-501; b) S. Fawell, J. Seery, Y. Daikh, C. Moore, L. L. Chen, B. Pepinsky, J. Barsoum, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 664-668.
- [148] B. Felding-Habermann, B. M. Mueller, C. A. Romerdahl, D. A. Cheresch, *J. Clin. Invest.* **1992**, *89*, 2018-2022.
- [149] J. Zhou, J. J. Rossi, *Oligonucleotides* **2011**, *21*, 1-10.
- [150] a) B. J. Hicke, A. W. Stephens, *J. Clin. Invest.* **2000**, *106*, 923-928; b) A. C. Yan, M. Levy, *RNA Biol.* **2009**, *6*, 316-320.
- [151] J. O. McNamara, E. R. Andrechek, Y. Wang, K. D. Viles, R. E. Rempel, E. Gilboa, B. A. Sullenger, P. H. Giangrande, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1005-1015.
- [152] J. Zhou, P. Swiderski, H. Li, J. Zhang, C. P. Neff, R. Akkina, J. J. Rossi, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 3094-3109.
- [153] S. E. Lupold, B. J. Hicke, Y. Lin, D. S. Coffey, *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4029-4033.
- [154] a) N. Takai, R. Hamanaka, J. Yoshimatsu, I. Miyakawa, *Oncogene* **2005**, *24*, 287-291; b) S. Cory, J. M. Adams, *Cancer cell* **2005**, *8*, 5-6.
- [155] J. Zhou, H. Li, S. Li, J. Zaia, J. J. Rossi, *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 1481-1489.
- [156] P. D. Kwong, R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, W. A. Hendrickson, *Nature* **1998**, *393*, 648-659.
- [157] B. R. Martin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *301*, 790-796.
- [158] a) A. Calignano, G. L. Rana, A. Giuffrida, D. Piomelli, *Nature* **1998**, *394*, 277-281; b) J. M. Walker, A. G. Hohmann, W. J. Martin, N. M. Strangman, S. M. Huang, K. Tsou, *Life Sci.* **1999**, *65*, 665-673; c) J. Fernández-Ruiz, F. Berrendero, M. L. Hernández, J. A. Ramos, *Trends Neurosci.* **2000**, *23*, 14-20; d) R. I. Wilson, R. A. Nicoll, *Nature* **2001**, *410*, 588-592; e) R. E. Hampson, S. A. Deadwyler, *Life Sci.* **1999**, *65*, 715-723; f) V. Di Marzo, S. K. Goparaju, L. Wang, J. Liu, S. Batkai, Z. Jarai, F. Fezza, G. I. Miura, R. D. Palmiter, T. Sugiura, G. Kunos, *Nature* **2001**, *410*, 822-825; g) A. Giuffrida, D. Piomelli, *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *108*, 151-158; h) L. De Petrocellis, D. Melck, T. Bisogno, V. Di Marzo, *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *108*, 191-209.
- [159] a) A. Calignano, I. Katona, F. Desarnaud, A. Giuffrida, G. La Rana, K. Mackie, T. F. Freund, D. Piomelli, *Nature* **2000**, *408*, 96-101; b) D. Baker, G. Pryce, J. L. Croxford, P. Brown, R. G. Pertwee, J. W. Huffman, L. Layward, *Nature* **2000**, *404*, 84-87; c) I. Galve-Roperh, C. Sanchez, M. L. Cortes, T. G. del Pulgar, M. Izquierdo, M. Guzman, *Nat. Med.* **2000**, *6*, 313-319; d) R. G. Pertwee, *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 635-664; e) I. Lastres-Becker, H. H. Hansen, F. Berrendero, R. De Miguel, A. Perez-Rosado, J. Manzanares, J. A. Ramos, J. Fernandez-Ruiz, *Synapse* **2002**, *44*, 23-35.
- [160] a) Z. Vogel, J. Barg, R. Levy, D. Saya, E. Heldman, R. Mechoulam, *J. Neurochem.* **1993**, *61*, 352-355; b) C. C. Felder, K. E. Joyce, E. M. Briley, J. Mansouri, K. Mackie, O. Blond, Y. Lai, A. L. Ma, R. L. Mitchell, *Mol. Pharmacol.* **1995**, *48*, 443-450.
- [161] W. Twitchell, S. Brown, K. Mackie, *J. Neurophysiol.* **1997**, *78*, 43-50.
- [162] S. A. Deadwyler, R. E. Hampson, B. A. Bennett, T. A. Edwards, J. Mu, M. A. Pacheco, S. J. Ward, S. R. Childers, *Recept. Channels* **1993**, *1*, 121-134.
- [163] a) W. Su-Jane, *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *469*, 47-55; b) M. Shen, T. M. Piser, V. S. Seybold, S. A. Thayer, *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 4322-4334.
- [164] a) M. Shen, S. A. Thayer, *Mol. Pharmacol.* **1998**, *54*, 459-462; b) M. E. Abood, G. Rizvi, N. Sallapudi, S. D. McAllister, *Neurosci. Lett.* **2001**, *309*, 197-201; c) A. D. Sinor, S. M. Irvin, D. A. Greenberg, *Neurosci. Lett.* **2000**, *278*, 157-160; d) F. Molina-Holgado, E. Pinteaux, J. D. Moore, E. Molina-Holgado, C. Guaza, R. M. Gibson, N. J. Rothwell, *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 6470-6474; e) M. van der Stelt, W. B. Veldhuis, G. W. van Haften, F. Fezza, T. Bisogno, P. R. Bar, G. A. Veldink, J. F. Vliegthart, V. Di Marzo, K. Nicolay, *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 8765-8771; f) D. Panikashvili, C. Simeonidou, S. Ben-Shabat, L. Hanus, A. Breuer, R. Mechoulam, E. Shohami, *Nature* **2001**, *413*, 527-531; g) W. B. Veldhuis, M. van der Stelt, M. W. Wadman, G. van Zadelhoff, M. Maccarrone, F. Fezza, G. A. Veldink, J. F. Vliegthart, P. R. Bar, K. Nicolay, V. Di Marzo, *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 4127-4133.
- [165] T. K. Eisenstein, J. J. Meissler, Q. Wilson, J. P. Gaughan, M. W. Adler, *J. Neuroimmunol.* **2007**, *189*, 17-22.
- [166] M. Maccarrone, *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 189-198.
- [167] a) B. R. Martin, D. R. Compton, B. F. Thomas, W. R. Prescott, P. J. Little, R. K. Razdan, M. R. Johnson, L. S. Melvin, R. Mechoulam, W. Susan J, *Pharmacol., Biochem. Behav.* **1991**, *40*, 471-478; b) E. Fride, R. Mechoulam, *Eur. J. Pharmacol.* **1993**, *231*, 313-314; c) T. Sugiura, T. Kodaka, S. Nakane, T. Miyashita, S. Kondo, Y. Suhara, H. Takayama, K. Waku, C. Seki, N. Baba, Y. Ishima, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 2794-2801.

- [168] M. L. Lopez-Rodriguez, A. Viso, S. Ortega-Gutierrez, I. Lastres-Becker, S. Gonzalez, J. Fernandez-Ruiz, J. A. Ramos, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4505-4508.
- [169] W. A. Devane, L. Hanus, A. Breuer, R. G. Pertwee, L. A. Stevenson, G. Griffin, D. Gibson, A. Mandelbaum, A. Etinger, R. Mechoulam, *Science* **1992**, *258*, 1946-1949.
- [170] T. Sugiura, S. Kondo, A. Sukagawa, S. Nakane, A. Shinoda, K. Itoh, A. Yamashita, K. Waku, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *215*, 89-97.
- [171] L. Hanuš, S. Abu-Lafi, E. Fride, A. Breuer, Z. Vogel, D. E. Shalev, I. Kustanovich, R. Mechoulam, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98*, 3662-3665.
- [172] A. C. Porter, J.-M. Sauer, M. D. Knierman, G. W. Becker, M. J. Borna, J. Bao, G. G. Nomikos, P. Carter, F. P. Bymaster, A. B. Leese, C. C. Felder, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *301*, 1020-1024.
- [173] a) C. C. Felder, E. M. Briley, J. Axelrod, J. T. Simpson, K. Mackie, W. A. Devane, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 7656-7660; b) S. R. Childers, T. Sexton, M. B. Roy, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 711-715; c) J. C. Pinto, F. Potie, K. C. Rice, D. Boring, M. R. Johnson, D. M. Evans, G. H. Wilken, C. H. Cantrell, A. C. Howlett, *Mol. Pharmacol.* **1994**, *46*, 516-522; d) W. Devane, L. Hanus, A. Breuer, R. Pertwee, L. Stevenson, G. Griffin, D. Gibson, A. Mandelbaum, A. Etinger, R. Mechoulam, *Science* **1992**, *258*, 1946-1949.
- [174] S. E. O'Sullivan, *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 576-582.
- [175] a) P. M. Zygmunt, J. Petersson, D. A. Andersson, H.-h. Chuang, M. Sorgard, V. Di Marzo, D. Julius, E. D. Hogestatt, *Nature* **1999**, *400*, 452-457; b) D. Smart, M. J. Gunthorpe, J. C. Jerman, S. Nasir, J. Gray, A. I. Muir, J. K. Chambers, A. D. Randall, J. B. Davis, *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *129*, 227-230.
- [176] a) P. Roger G, *Pharmacol. Ther.* **2002**, *95*, 165-174; b) E. Ryberg, N. Larsson, S. Sjögren, S. Hjorth, N. O. Hermansson, J. Leonova, T. Elebring, K. Nilsson, T. Drmota, P. J. Greasley, *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 1092-1101; c) J. E. Lauckner, J. B. Jensen, H.-Y. Chen, H.-C. Lu, B. Hille, K. Mackie, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 2699-2704.
- [177] a) V. Di Marzo, A. Fontana, H. Cadas, S. Schinelli, G. Cimino, J.-C. Schwartz, D. Piomelli, *Nature* **1994**, *372*, 686-691; b) H. Cadas, E. di Tomaso, D. Piomelli, *J. Neurosci.* **1997**, *17*, 1226-1242; c) Y. Okamoto, J. Morishita, K. Tsuboi, T. Tonai, N. Ueda, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 5298-5305.
- [178] C. J. Hillard, W. S. Edgmond, A. Jarrahian, W. B. Campbell, *J. Neurochem.* **1997**, *69*, 631-638.
- [179] a) J. N. Crawley, R. L. Corwin, J. K. Robinson, C. C. Felder, W. A. Devane, J. Axelrod, *Pharmacol., Biochem. Behav.* **1993**, *46*, 967-972; b) P. B. Smith, D. R. Compton, S. P. Welch, R. K. Razdan, R. Mechoulam, B. R. Martin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1994**, *270*, 219-227; c) M. E. Abood, B. R. Martin, *Trends Pharmacol. Sci.* **1992**, *13*, 201-206; d) D. Piomelli, M. Beltramo, S. Glasnapp, S. Y. Lin, A. Goutopoulos, X. Q. Xie, A. Makriyannis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 5802-5807.
- [180] D. G. Deutsch, S. A. Chin, *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *46*, 791-796.
- [181] M. Maccarrone, M. van der Stelt, A. Rossi, G. A. Veldink, J. F. G. Vliegthart, A. F. Agrò, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32332-32339.
- [182] M. Beltramo, N. Stella, A. Calignano, S. Y. Lin, A. Makriyannis, D. Piomelli, *Science* **1997**, *277*, 1094-1097.
- [183] D. Fegley, S. Kathuria, R. Mercier, C. Li, A. Goutopoulos, A. Makriyannis, D. Piomelli, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 8756-8761.
- [184] a) D. G. Deutsch, N. Ueda, S. Yamamoto, *Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty Acids* **2002**, *66*, 201-210; b) D. G. Deutsch, S. T. Glaser, J. M. Howell, J. S. Kunz, R. A. Puffenbarger, C. J. Hillard, N. Abumrad, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 6967-6973; c) C. J. Hillard, D. M. Wilkison, W. S. Edgmond, W. B. Campbell, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1257*, 249-256; d) N. Ueda, Y. Kurahashi, S. Yamamoto, T. Tokunaga, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 23823-23827.
- [185] D. F. Woodward, R. W. C. Carling, C. L. Cornell, H. G. Fliri, J. L. Martos, S. N. Pettit, Y. Liang, J. W. Wang, *Pharmacol. Ther.* **2008**, *120*, 71-80.
- [186] W. S. Edgmond, C. J. Hillard, J. R. Falck, C. S. Kearn, W. B. Campbell, *Mol. Pharmacol.* **1998**, *54*, 180-188.
- [187] S. T. Glaser, N. A. Abumrad, F. Fatade, M. Kaczocha, K. M. Studholme, D. G. Deutsch, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 4269-4274.
- [188] C. J. Hillard, A. Jarrahian, *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *108*, 123-134.
- [189] C. J. Hillard, A. Jarrahian, *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *140*, 802-808.
- [190] M. J. McFarland, T. K. Bardell, M. L. Yates, E. A. Placzek, E. L. Barker, *Mol. Pharmacol.* **2008**, *74*, 101-108.
- [191] S. Kathuria, S. Gaetani, D. Fegley, F. Valino, A. Duranti, A. Tontini, M. Mor, G. Tarzia, G. L. Rana, A. Calignano, A. Giustino, M. Tattoli, M. Palmery, V. Cuomo, D. Piomelli, *Nat. Med.* **2003**, *9*, 76-81.
- [192] M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, in *Vitamin. Horm., Vol. Volume 62*, Academic Press, **2001**, pp. 95-131.
- [193] M. L. Lopez-Rodriguez, A. Viso, S. Ortega-Gutierrez, C. J. Fowler, G. Tiger, E. de Lago, J. Fernandez-Ruiz, J. A. Ramos, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1512-1522.

- [194] a) A. N. Gifford, M. Bruneus, S. Lin, A. Goutopoulos, A. Makriyannis, N. D. Volkow, S. J. Gatley, *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, 383, 9-14; b) R. G. Pertwee, S. R. Fernando, G. Griffin, V. Abadji, A. Makriyannis, *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, 272, 73-78.
- [195] a) V. Di Marzo, G. Griffin, L. De Petrocellis, I. Brandi, T. Bisogno, W. Williams, M. C. Grier, S. Kulasegram, A. Mahadevan, R. K. Razdan, B. R. Martin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, 300, 984-991; b) M. L. Lopez-Rodriguez, A. Viso, S. Ortega-Gutierrez, C. J. Fowler, G. Tiger, E. de Lago, J. Fernandez-Ruiz, J. A. Ramos, *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, 38, 403-412; c) G. Ortar, A. Ligresti, L. De Petrocellis, E. Morera, V. Di Marzo, *Biochem. Pharmacol.* **2003**, 65, 1473-1481; d) A. Ligresti, E. Morera, M. Van Der Stelt, K. Monory, B. Lutz, G. Ortar, V. Di Marzo, *Biochem. J.* **2004**, 380, 265-272.
- [196] S. Lin, A. D. Khanolkar, P. Fan, A. Goutopoulos, C. Qin, D. Papahadjis, A. Makriyannis, *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 5353-5361.
- [197] B. Chini, M. Parenti, *J. Mol. Endocrinol.* **2004**, 32, 325-338.
- [198] M. J. McFarland, E. L. Barker, *Life Sci.* **2005**, 77, 1640-1650.
- [199] J. Fu, G. Bottegoni, O. Sasso, R. Bertorelli, W. Rocchia, M. Masetti, A. Guijarro, A. Lodola, A. Armirotti, G. Garau, T. Bandiera, A. Reggiani, M. Mor, A. Cavalli, D. Piomelli, *Nat. Neurosci.* **2012**, 15, 64-69.
- [200] a) D. A. Brown, E. London, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 17221-17224; b) L. J. Pike, X. Han, K.-N. Chung, R. W. Gross, *Biochemistry* **2002**, 41, 2075-2088; c) B. Razani, S. E. Woodman, M. P. Lisanti, *Pharmacol. Rev.* **2002**, 54, 431-467.
- [201] a) J. E. Schnitzer, J. Allard, P. Oh, *Am. J. Phys.* **1995**, 268, H48-H55; b) T. Aoki, R. Nomura, T. Fujimoto, *Exp. Cell Res.* **1999**, 253, 629-636.
- [202] a) D. Melck, T. Bisogno, L. De Petrocellis, H.-h. Chuang, D. Julius, M. Bifulco, V. Di Marzo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, 262, 275-284; b) S. Muthian, K. Nithipatikom, W. B. Campbell, C. J. Hillard, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, 293, 289-295; c) A. Jarrahian, S. Manna, W. S. Edgemond, W. B. Campbell, C. J. Hillard, *J. Neurochem.* **2000**, 74, 2597-2606.
- [203] F. Fezza, S. Oddi, M. Di Tommaso, C. De Simone, C. Rapino, N. Pasquariello, E. Dainese, A. Finazzi-Agro, M. Maccarrone, *J. Lipid Res.* **2008**, 49, 1216-1223.
- [204] S. Oddi, F. Fezza, N. Pasquariello, C. De Simone, C. Rapino, E. Dainese, A. Finazzi-Agro, M. Maccarrone, *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, 65, 840-850.
- [205] P. M. Gocze, D. A. Freeman, *Cytometry* **1994**, 17, 151-158.
- [206] S. Martin, R. G. Parton, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, 7, 373-378.
- [207] a) J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, 8, 3639-3642; b) P. M. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, 47, 8350-8358; c) P. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, 47, 3442-3444.
- [208] F. Seela, V. R. Sirivolu, *Chem. Biodiversity* **2006**, 3, 509-514.
- [209] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057-3064.
- [210] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, 114, 2708-2711.
- [211] D. C. Seldin, S. Adelman, K. F. Austen, R. L. Stevens, A. Hein, J. P. Caulfield, R. G. Woodbury, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1985**, 82, 3871-3875.
- [212] a) J. Bienenstock, M. Tomioka, H. Matsuda, R. H. Stead, G. Quinonez, G. T. Simon, M. D. Coughlin, J. A. Denburg, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **1987**, 82, 238-243; b) D. Johnson, W. Krenger, *Neurochem. Res.* **1992**, 17, 939-951.
- [213] K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 16, 4467-4470.
- [214] J. Asakura, M. J. Robins, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 4928-4933.
- [215] a) Y. Choi, L. Li, S. Grill, E. Gullen, C. S. Lee, G. Gumina, E. Tsujii, Y. C. Cheng, C. K. Chu, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 2538-2546; b) J. R. Mercer, L. H. Xu, E. E. Knaus, L. I. Wiebe, *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 1289-1294.
- [216] F. Seela, V.-R. Sirivolu, *Helv. Chim. Acta* **2007**, 90, 535-552.
- [217] a) L. J. Hoyos, M. Primet, H. Pralialud, *J. Chem. Soc. Farad. Trans.* **1992**, 88, 113-119; b) X. L. Seoane, P. C. L'Argentiere, N. S. Fígoli, A. Arcoya, *Catal. Lett.* **1992**, 16, 137-148.
- [218] H. A. Held, A. Roychowdhury, S. A. Benner, *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2003**, 22, 391-404.
- [219] D. J. Dellinger, Z. n. Timár, J. Myerson, A. B. Sierzchala, J. Turner, F. Ferreira, Z. n. Kupihár, G. Dellinger, K. W. Hill, J. A. Powell, J. R. Sampson, M. H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 11540-11556.
- [220] S. Choung, Y. J. Kim, S. Kim, H. O. Park, Y. C. Choi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 342, 919-927.
- [221] J. Hong, Y. Huang, J. Li, F. Yi, J. Zheng, H. Huang, N. Wei, Y. Shan, M. An, H. Zhang, J. Ji, P. Zhang, Z. Xi, Q. Du, Z. Liang, *FASEB J.* **2010**, 24, 4844-4855.
- [222] J. Harder, PhD Thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München **Unveröffentlicht**.
- [223] I. V. Koval, *Russ. Chem. Rev.* **1994**, 63, 735-750.

- [224] a) G. Xu, M. R. Chance, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2437-2449; b) Y. Xia, R. G. Cooks, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 2856-2864; c) M. Bonifacic, K. D. Asmus, *J. Phys. Chem. C* **1976**, *80*, 2426-2430.
- [225] M. Bobrov, N. Gretskeya, O. Payet, V. Bezuglov, T. Durand, L. Maurin, F. Turrel, O. Adjali, M. Rinaldi-Carmona, A. Muller, *Life Sci.* **2005**, *77*, 1425-1440.
- [226] G. V. Sagar Reddy, G. V. Rao, R. V. K. Subramanyam, D. S. Iyengar, *Synth. Commun.* **2000**, *30*, 2233-2237.
- [227] T. Parkkari, J. R. Savinainen, K. H. Raitio, S. M. Saario, L. Matilainen, T. Sirvio, J. T. Laitinen, T. Nevalainen, R. Niemi, T. Jarvinen, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5252-5258.
- [228] K. Bowden, I. M. Heilbron, E. R. H. Jones, B. C. L. Weedon, *J. Chem. Soc. (Resumed)* **1946**, 39-45.
- [229] a) X. Z. Song, W. Jentzen, L. Jaquinod, R. G. Khoury, C. J. Medforth, S. L. Jia, J. G. Ma, K. M. Smith, J. A. Shelnutt, *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 2117-2128; b) X.-Z. Song, L. Jaquinod, W. Jentzen, D. J. Nurco, S.-L. Jia, R. G. Khoury, J.-G. Ma, C. J. Medforth, K. M. Smith, J. A. Shelnutt, *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 2009-2019.
- [230] C. B. Minkenberg, L. Florusse, R. Eelkema, G. J. M. Koper, J. H. van Esch, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11274-11275.
- [231] J.-M. Barbe, G. Canard, S. Brandès, R. Guillard, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, *2005*, 4601-4611.
- [232] a) A. D. Adler, F. R. Longo, J. D. Finarelli, J. Goldmacher, J. Assour, L. Korsakoff, *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 476-476; b) A. D. Adler, F. R. Longo, W. Shergalis, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 3145-3149.
- [233] N. Asano, S. Uemura, T. Kinugawa, H. Akasaka, T. Mizutani, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5320-5326.
- [234] M. E. El-Khouly, J. B. Ryu, K.-Y. Kay, O. Ito, S. Fukuzumi, *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 15444-15453.
- [235] a) L. Ji, X. Chen, *Cell Res.* **2012**, *22*, 624-636; b) J.-P. Shaw, K. Kent, J. Bird, J. Fishback, B. Froehler, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 747-750.
- [236] C. C. Richardson, *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 2084-2092.
- [237] Y. Ikeda, D. Kubota, Y. Nagasaki, *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 1685-1690.
- [238] a) G. I. Bell, C. F. Burant, J. Takeda, G. W. Gould, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 19161-19164; b) J. E. Pessin, G. I. Bell, *Annu. Rev. Physiol.* **1992**, *54*, 911-930; c) L. J. Elsas, N. Longo, *Annu. Rev. Med.* **1992**, *43*, 377-393.
- [239] a) T. A. Smith, *Br. J. Biomed. Sci.* **1999**, *56*, 285-292; b) R. A. Medina, G. I. Owen, *Biol. Res.* **2002**, *35*, 9-26; c) C. Binder, L. Binder, D. Marx, A. Schauer, W. Hiddemann, *Anticancer Res.* **1997**, *17*, 4299-4304.
- [240] a) M. A. Beaven, J. R. Cunha-Melo, *Prog. Allergy* **1988**, *42*, 123-184; b) R. I. Ludowyke, I. Peleg, M. A. Beaven, R. S. Adelstein, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 12492-12501; c) M. Benhamou, V. Stephan, K. C. Robbins, R. P. Siraganian, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 7310-7314; d) K. Ozawa, Z. Szallasi, M. G. Kazanietz, P. M. Blumberg, H. Mischak, J. F. Mushinski, M. A. Beaven, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 1749-1756.
- [241] a) J. R. Gordon, P. R. Burd, S. J. Galli, *Immunol. Today* **1990**, *11*, 458-464; b) J. S. Marshall, J. Bienenstock, *Springer Sem. Immunopathol.* **1990**, *12*, 191-202.
- [242] a) L. Aloe, S. D. Skaper, A. Leon, R. Levi-Montalcini, *Autoimmunity* **1994**, *19*, 141-150; b) B. M. Weichman, *Inflammation Res.* **1988**, *25*, 205-206.
- [243] a) T. Kobayashi, T. Miura, T. Haba, M. Sato, I. Serizawa, H. Nagai, K. Ishizaka, *J. Immunol.* **2000**, *164*, 3855-3861; b) C. M. Williams, S. J. Galli, *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 455-462; c) R. Pawankar, M. Okuda, H. Yssel, K. Okumura, C. Ra, *J. Clin. Invest.* **1997**, *99*, 1492-1499.
- [244] R. P. Siraganian, R. O. de Castro, E. A. Barbu, J. Zhang, *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 4933-4940.
- [245] J. Zhang, E. H. Berenstein, R. L. Evans, R. P. Siraganian, *J. Exp. Med.* **1996**, *184*, 71-79.
- [246] M. Bajpai, P. Chopra, S. G. Dastidar, A. Ray, *Exp. Opin. Invest. Drugs* **2008**, *17*, 641-659.
- [247] M. P. Sanderson, S. J. Gelling, J. F. Rippmann, A. Schnapp, *Cell. Immunol.* **2010**, *262*, 28-34.
- [248] a) J. L. Croxford, T. Yamamura, *J. Neuroimmunol.* **2005**, *166*, 3-18; b) S. A. Rieder, A. Chauhan, U. Singh, M. Nagarkatti, P. Nagarkatti, *Immunobiology* **2010**, *215*, 598-605.
- [249] F. Gnerlich, PhD Thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München **Unveröffentlicht**.
- [250] V. Brantl, Bachelor Thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München **2010**.